

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Fakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Antje Schulte
aus Arnsberg

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2002

Expressionsmuster „Gewebe-spezifischer“ Antigene in Thymus-Epithelzellen der Maus

Gutachter: Prof. Dr. Volker Schirmacher
Prof. Dr. Volker Lehmann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	8
1.1 Überblick über das Immunsystem	8
1.2 T-Zellen, ihre Funktion und Reifung	10
1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor	11
1.2.2 $\alpha\beta$ -T-Zellen sind MHC-restringiert	12
1.2.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen	13
1.3 Toleranz	14
1.3.1 Der Thymus ist der Ort der T-Zell-Reifung und der Toleranz-Induktion	14
1.3.2 Der Aufbau des Thymus	15
1.3.3 Rearrangierung, „Lineage Commitment“, Positive Selektion	16
1.3.4 Zentrale Toleranz und negative Selektion	16
1.3.4.1 Beteiligte Zelltypen	17
1.3.4.2 „Promiscuous“ Antigenexpression	18
1.3.4.3 Regulation	19
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit: Expressionsmuster „Gewebe-spezifischer“ Antigene in Thymuszellen der Maus	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Puffer und Lösungen	23
2.1.3 Zellkulturmedien	24
2.1.4 Medien für Bakterien	25
2.1.5 Antikörper	27
2.1.6 Verwendete Bakterien	28
2.1.7 Tiere	28
2.1.8 Primer für die Genotypisierung	28
2.1.8.1 hCRP-Primer	28
2.1.8.2 PLP	29

2.1.9 Peptide	29
2.1.10 Puffer und Lösungen für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Herstellung von Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	31
2.2.1.1 PLP	31
2.2.1.2 hCRP	32
2.2.1.3 S100β	32
2.2.1.4 Insulin	32
2.2.2 <i>in situ</i> -Hybridisierung	33
2.2.3 Präzipitation von Nukleinsäuren in wässriger Lösung	34
2.2.4 Phenolextraktion	34
2.2.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	34
2.2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	34
2.2.7 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA zur Sondenherstellung	35
2.2.8 Plasmid-Präparation	35
2.2.9 Isolierung von DNA zur Genotypisierung	35
2.2.10 Amplifizierung von spezifischen Sequenzen aus genomischer DNA mittels PCR zur Genotypisierung	36
2.2.11 Isolierung von Thymuszell-Populationen	36
2.2.12 Anreicherung von Epithelzellen im FACS	38
2.2.13 Anreicherung medullärer Epithelzellen per MACS	38
2.2.14 Gewinnung der Makrophagen und DC aus der Rosettenfraktion	39
2.2.15 Präparation von Hepatozyten	39
2.2.16 Präparation von Milzzellen	39
2.2.17 Kultivierung von T-Zell-Klonen	40
2.2.18 Kultivierung sonstiger Zelllinien	40
2.2.19 Einfrieren und Auftauen von Zellen	40
2.2.20 Generierung von T-Zell-Linien	40
2.2.21 Nachweis von Antigen-Präsentation auf Epithelzellen mit T-Zell-Linien (Proliferationsassay)	41

2.2.22 Immunhistochemie	41
2.2.22.1 Gefrierschnitte	41
2.2.22.2 Zytospin	41
2.2.22.3 Immunhistochemischer Nachweis von PLP	42
2.2.22.4 Immunhistochemischer Nachweis von S100 β	42
2.2.22.5 Immunhistochemischer Nachweis von P1A	42
2.2.22.6 Immunhistochemischer Nachweis von Somatostatin	43
2.2.22.7 Immunhistochemischer Nachweis von MOG	43
2.2.22.8 Immunhistochemischer Nachweis von Insulin auf Gewebeschnitten	43
2.2.22.9 Immunhistochemischer Nachweis von Insulin auf mTEZ	43
2.2.22.10 PLP-Doppelfluoreszenzanalyse	44
2.2.23 Fotografische Dokumentation mikroskopischer Präparate	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Isolierung von Thymuszell-Populationen	45
3.1.1 Isolierung von mTEZ und kTEZ mittels Fluoreszenz-Sortierung	45
3.1.2 Isolierung von tDC und Makrophagen im FACS	46
3.1.3 Isolierung von UEA+-mTEZ mittels MACS	47
3.2 Detektion von ektoptisch exprimierter mRNA auf Einzelzellebene	49
3.2.1 Detektion von PLP	50
3.2.2 Detektion von S100 β	52
3.2.3 Detektion von hCRP	53
3.2.4 Detektion von Insulin	55
3.2.5 Zusammenfassung der mRNA-Analyse mittels ISH	56
3.3 Detektion ektoptisch exprimierter Proteine auf Einzelzellebene	57
3.3.1 Detektion von PLP	58
3.3.1.1 O10 färbt spezifisch die weiße Substanz in Gehirnschnitten von PLP+/+-Mäusen	58
3.3.1.2 PLP kann in der Medulla und im Kortex des Thymus detektiert werden	59

3.3.1.3 PLP ist in mTEZ und kTEZ detektierbar	60
3.3.1.4 Die Expressionsmuster von mTEZ-Subpopulationen unterscheiden sich voneinander	63
3.3.1.5 Mittels Immunfluoreszenz ist PLP in jeder UEA+-mTEZ detektierbar	64
3.3.1.6 PLP ist in tDC nicht nachweisbar	66
3.3.2 Detektion von S100 β	68
3.3.2.1 Nachweis der Spezifität auf Gehirn-Gefrierschnitten	68
3.3.2.2 S100 β ist in Thymus-Gefrierschnitten detektierbar	69
3.3.2.3 S100 β ist in mTEZ und kTEZ nachweisbar	70
3.3.2.4 Die Expressionsmuster von G8.8+- und UEA+-mTEZ unterscheiden sich voneinander	71
3.3.2.5 Durch Immunfluoreszenz kann S100 β in jeder betrachteten UEA+-mTEZ nachgewiesen werden.	72
3.3.2.6 S100 β ist in tDC nicht nachweisbar	74
3.3.2.7 Zusammenfassung	76
3.3.3 Detektion von Insulin	76
3.3.3.1 Insulin kann auf Pankreas-Gefrierschnitten nachgewiesen werden	76
3.3.3.2 Insulin kann in UEA+-mTEZ nachgewiesen werden	78
3.3.3.3 Insulin ist in tDC nicht nachweisbar	79
3.3.3.4 Zusammenfassung	79
3.3.4 Detektion von Somatostatin	80
3.3.4.1 Somatostatin ist auf Pankreas-Gefrierschnitten detektierbar	80
3.3.4.2 Somatostatin ist in mTEZ nachweisbar, in kTEZ jedoch nicht	81
3.3.4.3 Mittels Immunfluoreszenz kann Somatostatin in jeder betrachteten UEA+-mTEZ nachgewiesen werden.	82
3.3.4.4 Somatostatin ist in tDC nicht nachweisbar	83
3.3.4.5 Zusammenfassung	85
3.3.5 Detektion von P1A	85
3.3.5.1 P1A kann im Hoden nachgewiesen werden	85
3.3.5.2 P1A ist in mTEZ, aber nicht in kTEZ nachweisbar	86

3.3.5.3 Das Expressionsmuster von UEA+- und G8.8+-mTEZ unterscheidet sich nicht	87
3.3.5.4 Mittels Immunfluoreszenz kann P1A in jeder betrachteten UEA+-mTEZ detektiert werden.	88
3.3.5.5 P1A kann in tDC nicht nachgewiesen werden	90
3.3.5.6 Zusammenfassung	91
3.3.6 Detektion von MOG	91
3.3.6.1 MOG kann in Gehirnschnitten nachgewiesen werden	92
3.3.6.2 MOG ist auf G8.8+-mTEZ nicht nachweisbar	93
3.3.6.3 MOG ist nicht in tDC nachweisbar	94
3.3.7 Zusammenfassung	94
3.4 Ko-Expression ektopisch exprimierter Proteine in UEA+-mTEZ	95
3.4.1 PLP und P1A werden ko-exprimiert	95
3.4.2 PLP und S100 β werden ko-exprimiert	98
3.4.3 PLP und Somatostatin werden ko-exprimiert	101
3.4.4 Zusammenfassung	102
3.5 Funktionelle Assays	102
4 Diskussion	105
4.1 Die Heterogenität der Proteinexpression in mTEZ - Ursachen und Konsequenzen für die Induktion zentraler Toleranz	108
4.1.1 Ist die Expression der Autoantigene mit dem „normaler“ Antigenen vergleichbar?	108
4.1.2 Konsequenzen - ein zeitgesteuertes Modell des „serial scanning“?	110
4.1.3 Präsentieren mTEZ Antigen autonom?	113
4.2 Welche molekularen Mechanismen liegen der ektopischen Expression in mTEZ zugrunde?	116
4.3 Ausblick	118
5 Zusammenfassung	121
6 Literatur	124
7 Danksagungen	132

Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CY	Cyanin
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat
DIC	Differenz-Kontrast
DIG	Digoxigenin
EAE	Experimental Autoimmune Encephalitis
ECM	Extrazelluläre Matrix
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	"fragment crystallizable"
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GvH	"Graft versus Host"
hCRP	humanes C-reaktives Protein
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
ISH	in situ-Hybridisierung
kTEZ	kortikale Thymusepithelzelle
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

MS	Multiple Sklerose
mTEZ	medulläre Thymusepithelzelle
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLP	Proteolipid Protein
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
SAP	Serum Amyloid P-Komponente
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIFF	Tagged Image File Format
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
UEA	Ulex europaeus Hämagglutinin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Das Immunsystem höherer Organismen hat die Aufgabe, den Organismus vor Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu schützen. Es spielt außerdem eine Rolle bei der Vernichtung entarteter körpereigener Zellen [1].

Wie wichtig das Funktionieren des Immunsystem für den Organismus ist, wird deutlich, wenn es versagt oder selbst den Organismus schädigt. Versagt das Immunsystem, wie bei der Erkrankung AIDS, kommt es zu opportunistischen Infektionen und Tumorerkrankungen [2, 3], die bislang auch bei intensiver medizinischer Behandlung meist zum Tod führen. Auch bei älteren Menschen, deren Immunsystem geschwächt sein kann, zeigt sich eine erhöhte Neigung zu Infektionen und Tumoren [4, 5]. Aber auch das Immunsystem selbst kann gesunde Zellen des eigenen Organismus angreifen und Autoimmunerkrankungen induzieren, die zum Tod führen können (z.B. Multiple Sklerose [6]). In einem gesunden Organismus ist das Immunsystem reaktiv genug, um Pathogene und maligne Zellen zu eliminieren, aber nicht so aggressiv, dass auch gesundes eigenes Gewebe angegriffen wird. Hinter dieser Balance stecken komplexe Mechanismen, die in dieser Arbeit untersucht werden sollen.

1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Multi-Organsystem, das sich zellulärer und humoraler Mechanismen bedient und verschiedenste Kompartimente, Zelltypen, Gewebe und Organe umfasst. Es ist eng mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) vernetzt [7, 8, 9, 10]. Auch nicht lymphoide Gewebe sind in die Immunantwort mit einbezogen - so spielen die epithelialen Oberflächen des Körpers eine große Rolle bei der Abwehr von Pathogenen, indem sie eine erste mechanische, mikrobiologische und chemische Barriere bilden. Pathogene, die diese Barriere überwinden können, können in den unteren Schichten der epithelialen Barriere von Phagozyten (Makrophagen) unspezifisch aufgenommen und inaktiviert werden. Eindringene Bakterien werden außerdem anhand ihrer Oberflächenmarker von evolutionär alten humoralen Komponenten, dem Komplementsystem, erkannt. Diese binden an Bakterien und lysieren sie über den „alternativen“ Weg der Komplementkaskade [11]. Das Komplementsystem rekrutiert, wenn es aktiviert wird, auch inflammatorische Zellen wie Neutrophile und Monozyten bzw. Makrophagen, Mastzellen und Eosinophile, wodurch Entzündungsprozesse eingeleitet und in Gang gehalten werden. Eine wichtige Rolle spielen weitere antimikrobielle Peptide, z.B. die Defensine, die konstitutiv von Epithelzellen exprimiert werden oder induzierbar sind. Sie binden z.B. an die Oberfläche von Mikroorganismen, bilden dort Poren oder lösen sie wie ein Detergenz auf. Sie

wirken außerdem auf Bestandteile des Immunsystems, indem sie die Produktion von inflammatorischen Zytokinen (IL-1, TNF- α , IFN- γ) induzieren, vasoregulatorisch wirken, T-Zell-Proliferation stimulieren und Neutrophile und Makrophagen aktivieren [12, 13, 14].

Die beschriebenen Mechanismen gehören zur angeborenen Immunität. Sie sind evolutionär sehr alt. Auch niedere Tiere schützen sich mit humoralen und zellulären Mechanismen vor Pathogenen, z.B. verfügen Insekten über Defensine und andere antimikrobielle Peptide und über mesodermale Hämozyten, die Pathogene einkapseln können. Homologien zu Genen, deren Produkte bei Tieren Teil immunologischer Signalkaskaden sind, sind sogar bei Pflanzen gefunden worden, diese schützen sich auch mittels antimikrobieller Peptide, z.B. mit den zysteinreichen Thioninen [13, 14].

Dieser Zweig des Immunsystems steht dem Organismus stets ohne Zeitverzögerung zur Verfügung. Die verwendeten Mechanismen stützen sich auf die Erkennung bakterienspezifischer Polysaccharide, viraler doppelsträngiger RNS und anderer mikrobieller Bestandteile, die sich im Lauf der Evolution kaum geändert haben, oder sie machen sich sogar wie beim Beispiel der Defensine chemische und physikalische Eigenschaften aller Organismen zunutze.

Komplexere Mechanismen treten erstmals in der Phylogenese bei den Knorpelfischen auf: die adaptive Immunität. Die adaptive Immunität besitzt gegenüber der angeborenen Immunität die Vorteile, hoch antigenspezifisch zu sein, gegen mehr Antigene reagieren zu können, während des Ablaufs der Immunantwort höhere Affinitäten erreichen zu können (Affinitätsreifung) und außerdem bei einem zweiten Angriff des Pathogens schneller und effektiver reagieren zu können (immunologisches Gedächtnis). Diesen Vorteilen steht gegenüber, dass die adaptive Immunität in Falle einer Primärantwort erst nach Tagen einsatzbereit ist - im Falle von Nonrespondern, also Individuen, deren adaptives Immunsystem aufgrund ihrer genetischen Ausstattung nicht gegen bestimmte Antigene reagieren kann, da ihre Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (MHC-Moleküle) die Peptide der Pathogene nicht binden können, kann es sogar vorkommen, dass keine adaptive Immunantwort zustande kommt oder sie so langsam ausreichende Affinitäten erreicht, dass das Pathogen die Oberhand gewinnt. Nur das Zusammenspiel von schneller, angeborener Immunität und langsamerer, adaptiver Immunität kann also den Organismus vor Pathogenen wirksam schützen. Die beiden Systeme sind miteinander eng verzahnt.

Die adaptive Immunantwort ist in humorale und zelluläre Komponenten unterteilt. Die humorale Immunität wird von den Antikörpern und der Komplementkaskade gebildet. Antikörper sind Proteine, die von B-Zellen sezerniert werden können und spezifisch an bestimmte Strukturen binden können. Diese Strukturen, allgemein Epitope genannt, können auf Pathogenen zu finden sein, aber auch harmlose Substanzen wie Tierschuppen oder Pollen können Zielstrukturen für Antikörper sein. Antikörper werden nach ihrer Struktur in verschiedene Klassen eingeteilt, die unterschiedliche Aufgaben besitzen. Antikörper können nicht nur selbst Pathogene und Toxine inaktivieren. Wenn sie an ein Pathogen binden, verändert sich die Struktur ihres Fc-Teils (Fc = „fragment crystallizable“) so, dass Zellen, die Fc-Rezeptoren tragen (z.B. Makrophagen) an die Antikörper binden können, durch diese Bindung aktiviert werden und dann das Pathogen angreifen können. Aber auch die Komplementkaskade kann an opsonisierte Pathogene binden und selbst die Lyse des Pathogens herbeiführen [15]. Auch dies ist ein Beispiel dafür, wie eng die beiden Komponenten des Immunsystems zusammenwirken.

Die zelluläre Immunität wird von T-Zellen vermittelt. Der Hauptteil der T-Zellen erkennt im Gegensatz zu B-Zellen Antigene nicht in ihrer nativen Konformation, sondern ist darauf angewiesen, dass ihnen kurze Peptidfragmente des Antigens in Verbindung mit Molekülen des MHC auf anderen Zellen präsentiert werden. Dies kann zur Aktivierung der Zelle und zur Proliferation führen. Was dann passiert, hängt davon ab, welcher Unterklasse die T-Zelle angehört - eine so aktivierte T-Zelle kann dann Faktoren ausschütten, die B-Zellen, andere T-Zellen oder Makrophagen stimulieren und aktivieren, oder sie kann selbst die betroffene Zelle lysieren. T-Zellen wirken so als Kontrollinstanz für B-Zellen und Makrophagen, da diese ohne die Hilfe von T-Zellen nicht in dieser Weise aktiviert werden können, aber sie bilden auch selbst eine potente Waffe gegen Virus-befallene oder entartete Zellen. Sie sind damit maßgeblich an der Eliminierung intrazellulärer Pathogene beteiligt.

1.2 T-Zellen, ihre Funktion und Reifung

Wie T-Zellen ihre Spezifität für Antigene erlangen, wie die Spezifität gewährleistet wird, wie sich gesunde körpereigene Zellen vor autoreaktiven T-Zellen schützen und wo die Reifung von T-Zellen stattfindet, soll wegen der Relevanz für die vorliegende Arbeit im folgenden näher betrachtet werden.

1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor

Über den T-Zell-Rezeptor (TZR) interagieren T-Zellen mit Peptid-MHC-Komplexen. Es ist das Molekül, über das das zelluläre Immunsystem Antigen wahrnimmt. Er liegt in zwei Heterodimeren vor: $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -Rezeptoren. Eine Zelle besitzt normalerweise nur einen TZR einer Klasse. Zwei Modelle versuchen zu beschreiben, wie entschieden wird, welche TZR-Klasse eine T-Zelle exprimiert: Das „separate lineage model“ postuliert zwei getrennte Linien von Vorläufern, während das „sequential rearrangement model“ davon ausgeht, dass die Prä-T-Zelle zunächst die γ - und δ -Gene rearrangiert und bei einem Scheitern der Rearrangierung die α - und β -Gene umzuordnen versucht. In jedem Fall aber führt die Rearrangierung des α -Locus dazu, dass der $\gamma\delta$ -TZR nicht mehr gebildet werden kann, da die δ -Gene inmitten des α -Locus liegen und bei der Rearrangierung herausgeschnitten werden.

Die produktive Rearrangierung je eines Allels für die leichte Kette und für die schwere Kette führt in der Regel dazu, dass das andere Allel nicht rearrangiert wird, so dass nur eine funktionell rearrangierte Kette des jeweiligen Locus entsteht. Ausnahmen sind vom α -Locus bekannt - etwa 30 % der $\alpha\beta$ -T-Zellen besitzen eine zweite funktionell rearrangierte α -Kette und damit potentiell zwei verschiedene TZRs.

$\alpha\beta$ -TZRs erkennen Antigen nur in Form kurzer Peptide, die von MHC Klasse I- oder MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden. $\gamma\delta$ -TZRs erkennen demgegenüber auch freies Antigen und sind nicht auf Proteine beschränkt. Die Monomere, alle vier sind Teile der Immunglobulin-Superfamilie, sind untereinander mit Disulphidbrücken verknüpft. Sie sind außerdem mit dem CD3-Komplex assoziiert, der aus fünf verschiedenen invarianten Polypeptiden besteht (γ , δ , ϵ , ζ und η) und der die Signalübertragung gewährleistet [16, 17].

Die Polypeptide, die den TZR bilden, sind in variable und konstante Regionen unterteilt. Die variablen Regionen vermitteln die Bindung an Antigen, während die konstanten Regionen den TZR in der Zellmembran verankern. Die variablen Regionen werden von verschiedenen Gensegmenten kodiert, die während der Entstehung des TZR rearrangiert werden: V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Elemente für die β und die γ -Kette, während der α und δ -Kette das D-Element fehlt. Die V- und J-Elemente liegen im Genom in mehreren Varianten vor und werden, im Fall der β - und γ -Ketten zusammen mit einem von zwei D-Elementen, von Rekombinasen rearrangiert, woraufhin sie mit einem C-Teil zu einer transkribierbaren Einheit „gespleißt“ werden. Die zufällige Auswahl aus Dutzenden von V- und J-Elementen und deren Rearrangierung führt zu der großen Diversität der TZRs, die zusätzlich erhöht wird, indem wäh-

rend der Umordnung zufällig Nukleotide hinzugefügt oder abgeschnitten werden. Die daraus resultierenden α -Ketten werden ihrerseits mit einer zufällig entstandenen β -Kette zum TZR zusammengefügt [17, 18]. Der TZR ist also polygen, d.h. er setzt sich aus einer Vielzahl möglicher Gene zusammen. Die Vielgestaltigkeit des TZR konzentriert sich in der Region, in der er Peptid-MHC-Komplexe bindet: der CDR-Region im Zentrum der antigenbindenden Grube des TZR [19].

1.2.2 $\alpha\beta$ -T-Zellen sind MHC-restringiert

Der TZR reifer $\alpha\beta$ -T-Zellen ist zusätzlich zum CD3-Komplex entweder mit dem CD4- oder dem CD8-Korezeptor assoziiert, einem weiteren Korezeptor, der an nichtpolymorphe Teile des MHC bindet, damit die TZR-MHC-Bindung verstärkt und zusätzlich an der Signalkaskade der T-Zell-Aktivierung beteiligt ist. Anhand dieses Korezeptors können die T-Zellen in zwei Klassen unterteilt werden. Die beiden Klassen unterscheiden sich in ihrer Effektorfunktion, in der Klasse des MHC, die sie erkennen können, und in der Herkunft des Antigen, auf die sie ansprechen [20].

CD8⁺-T-Zellen erkennen üblicherweise neun bis zehn Aminosäuren lange Peptide im Kontext von MHC Klasse I-Molekülen, sie sind verantwortlich für die Eliminierung virusinfizierter oder entarteter Zellen. Sie töten durch direkten Zell-Zell-Kontakt: Entweder schütten sie, während sie an die Zielzelle gebunden sind, Perforin und Granzym aus, wodurch über den Kalziumeinstrom durch die so entstehenden Poren und das Granzym Apoptose induziert wird, oder sie lösen direkt Apoptose durch die Bindung des Fas-Liganden auf der Oberfläche der T-Zelle an das Fas-Molekül auf der Oberfläche der Zielzelle aus [17].

MHC Klasse I-Moleküle befinden sich auf der Oberfläche fast aller kernhaltiger Zellen und geben patrouillierenden T-Zellen einen Überblick über das Protein-Repertoire im Innern der Zelle. Dazu nehmen MHC Klasse I-Moleküle noch im Innern des endoplasmatischen Retikulums (ER), wo sie synthetisiert werden, Peptide auf, die zuvor im Zytoplasma von einem spezialisierten Proteasekomplex, dem Proteasom, aus zytosolischen Proteinen erzeugt worden und vom TAP-Transporter ins ER gebracht worden sind. Nach der Bindung des Peptids gelangen die MHC Klasse I-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche. Virale Infektionen oder abnormale Synthesen wie die Expression onkofetaler Antigene manifestieren sich so in einer Form an der Zelloberfläche, die von T-Zellen erkannt werden kann, so dass eine infizierte oder entartete Zelle direkt von aktivierten T-Zellen getötet werden kann.

Die andere Klasse von T-Zellen exprimiert CD4, einen Korezeptor, der die Bindung des TZR an MHC Klasse II-Moleküle vermittelt. MHC Klasse II-Moleküle finden sich nicht auf allen Körperzellen, sondern nur auf spezialisierten „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen wie DC, Makrophagen, B-Zellen und Thymus-Epithelzellen (TEZ). Sie binden Peptide, die mit 13 bis 15 AS länger sind als die, die von MHC Klasse I-Molekülen gebunden werden. Der Ursprung dieser Peptide unterscheidet sich in der Regel von dem der MHC Klasse I-gebundenen Peptide: Sie stammen aus Endosomen, in denen Proteine von Proteasen verdaut worden sind. Die Proteine können von außen stammen, sie können aber auch in der Zelle synthetisiert worden sein. In beiden Fällen werden sie in Endosomen in Peptide zerlegt, welche dann die invariante Kette der MHC Klasse II-Moleküle ersetzen, woraufhin der MHC Klasse II-Peptid-Komplex an die Oberfläche der Zelle wandert. MHC Klasse II-Peptid-Komplexe spiegeln also zusätzlich zu internen Syntheseprozessen die Umgebung der Zelle wider und können einen Befall mit extrazellulären Pathogenen signalisieren.

CD4⁺-T-Zellen sind in der Regel nicht zytotoxisch. Sie unterstützen stattdessen die humorale und zelluläre Immunantwort (T-Helfer-Zellen). Dabei werden sie wiederum in zwei Klassen unterteilt [21]. Die Th1-Zellen schütten nach Aktivierung inflammatorische Zytokine wie INF- γ , TNF- β und IL-2 aus, wodurch Makrophagen aktiviert werden. Sie können auch andere T-Zellen zur Proliferation bringen und Zielzellen induzieren, die MHC-Expression hochzuregulieren. Th2-Zellen steuern die humorale Immunantwort, indem sie Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-10 ausschütten, die B-Zellen stimulieren können. Welcher Zweig der Th-Antwort favorisiert wird, hängt von der Antigendosis, der Art des Antigens, der beteiligten antigenpräsentierenden Zelle und der lokalen Zytokinbalance ab. Dabei spielen auch die Zytokine eine Rolle, die von den Th-Zellen selbst sezerniert werden: IL-10 supprimiert die Aktivität der Th1-Zellen, IL-4 stimuliert Th2-Zellen, während IFN- γ sie supprimiert.

1.2.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen tauchen in der Ontogenese der Maus zwei Tage früher auf als $\alpha\beta$ -Zellen. Diese Population besteht zum großen Teil aus Zellen, die ähnliche Aufgaben wahrnehmen, wie $\alpha\beta$ -T-Zellen: Zytotoxizität, Aktivierung von Makrophagen und Hilfe für B-Zellen (durch IL-4 und CD40-L). Aber sie beinhaltet auch Zellen, die andere Aufgaben durchführen. In der Haut von Mäusen sind $\gamma\delta$ -T-Zellen häufig zu finden, wo sie eine Population mit homogenem, quasi-monoklonalem TZR stellen, die einen dendritischen Phänotyp annehmen und Kontakt zu Keratinozyten halten. Diese Population stellt die erste Welle der während der Ontogenese der Maus in die Peripherie ausgewanderten T-Zellen dar. Sie können inflammatorische Reaktionen aus-

lösen und scheinen deshalb eine besondere Rolle bei Infektionen und Verletzungen der Haut zu spielen [17].

Der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen am T-Zell-Pool variiert von Art zu Art, ihr prozentualer Anteil am T-Zell-Pool ist z.B. bei Paarhufern und Vögeln erheblich größer als bei den hier besprochenen Mäusen.

1.3 Toleranz

Unter Toleranz versteht man in der Immunologie sämtliche Phänomene, die eine Reaktion gegen körpereigene Strukturen verhindern, die potentiell tödlich ausgehen kann. Toleranz findet sich schon bei den besprochenen angeborenen Mechanismen des Immunsystems, z.B. verhindern Proteinkomplexe auf den Oberflächen intakter Zellen die Aktivierung des Komplementsystems. Man unterscheidet periphere und zentrale Toleranzmechanismen, die sich gegenseitig ergänzen. Hier sollen die Mechanismen besprochen werden, die zur zentralen Toleranz führen. Diese wird per Definition im Thymus vermittelt. Sie umfasst die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen durch Deletion und Anergisierung ebenso wie die Bildung regulatorischer $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen, die in der Peripherie autoreaktive Zellen anergisieren können [22, 23, 24, 25].

1.3.1 Der Thymus ist der Ort der T-Zell-Reifung und der Toleranz-Induktion

Um für den Körper „nützlich“ zu sein, müssen T-Zellen zwei Eigenschaften besitzen: Da alle $\alpha\beta$ -T-Zellen Antigen als Peptid im Kontext von MHC-Molekülen erkennen, müssen sie prinzipiell in der Lage sein, an Peptid-Selbst-MHC-Komplexe zu binden (Selbst-MHC-Restriktion). Diese Eigenschaft besitzen jedoch nicht alle Thymozyten - über 90% der entstehenden Thymozyten sind nicht in der Lage, Selbst-MHC zu erkennen.

Und da T-Zellen über sehr effektive Mechanismen zur Stimulation von Immunreaktionen und zur Vernichtung von Zellen verfügen, muss sichergestellt sein, dass sie diese Mechanismen nicht gegen eigene gesunde Zellen einsetzen - sie müssen tolerant gegen Selbstpeptid sein.

Um beides zu gewährleisten, durchlaufen T-Zell-Vorläufer im Thymus zwei Selektionsstadien: die positive und die negative Selektion. Dabei wirkt der Aufbau des Thymus und die dort vorhandene Mikroumgebung, bestehend aus verschiedenen Zelltypen, der extrazellulären Matrix (ECM) und Chemokin- und Zytokin-Gradienten, entscheidend mit.

1.3.2 Der Aufbau des Thymus

Der Thymus ist in zwei Kompartimente gegliedert, die Medulla und den Kortex, und von einer Kapsel aus Bindegewebe umgeben. Er entsteht am Tag 9,5 bis 10 der fötalen Entwicklung der Maus, indem sich das Endoderm der dritten Schlundtasche und das neuroektodermale Mesenchym der dritten und vierten Schlundtasche einstülpen [26]. Dabei scheint der Anstoß zur Organogenese vom Endoderm auszugehen, welches das Mesoderm dazu bringt, seinerseits Signale an das Endoderm zu übermitteln, die zur Differenzierung des Endoderms in die Epithelien des Thymus führen [27]. Aus dem Endoderm entstehen vermutlich die Epithelzellen von Medulla und Kortex, die von einer Kapsel aus Mesenchym umgeben werden, das während des Wachstums des frühen Thymus Wachstumssignale an die Thymusanlage abgibt und später an der Vaskularisierung beteiligt ist [26, 28]. Die Differenzierung des Endoderms zu kortikalen und medullären Epithelzellen geschieht mit Beteiligung der einwandernden Thymozyten [29, 30]

Im erwachsenen Tier sind die Kompartimente des Thymus deutlich voneinander zu unterscheiden [31]. Im Kortex dominiert das dichte Geflecht aus kortikalen Thymusepithelzellen (kTEZ), die, im Gegensatz zu stratifizierten epithelialen Zellen auf Körperoberflächen, ein dreidimensionales Netzwerk bilden [32]. In diesem Netzwerk liegen Fibroblasten, Makrophagen und viele unreife Thymozyten. Die Medulla besteht aus einem Geflecht, das von den gedrunenen, medullären Thymusepithelzellen (mTEZ) gebildet wird. Hier finden sich Makrophagen und dendritische Zellen. Beide Kompartimente werden außerdem von der extrazellulären Matrix (ECM) ausgefüllt, die aus Kollagenen, Glykosaminoglycanen und Glykoproteinen (z.B. Fibronectin) besteht, die von Epithelzellen und Fibroblasten abgeschieden wird [33].

Die beiden Epithelzellpopulationen lassen sich nicht nur anhand ihrer Struktur, sondern auch anhand bestimmter Marker bestimmen [34, 35, 36, 37, 38, 39]. Kortikales Epithel reagiert mit monoklonalen Antikörpern (CDR1, ER-TR4), medulläres Epithel bindet monoklonale Antikörper (G8.8, ER-TR5) und ein Lektin, das Hämagglutinin I des europäischen Stechginsters *Ulex europaeus* (UEA). Die Bindung des Lektins UEA an L-Fucosyl-Reste auf der Zelloberfläche teilt die mTEZ in zwei weitere Populationen. Die UEA⁺-Population könnte ein späteres Reifestadium der mTEZ darstellen.

T-Zell-Vorläufer erreichen den Thymus über die Blutbahn und treten an der Grenze zwischen Kortex und Medulla in den Thymus ein, wo sie innerhalb von etwa drei Wochen zwei Selektionsprozesse ihrer Entwicklung durchmachen müssen: die positive und die negative Selektion [40].

1.3.3 Rearrangierung, „Lineage Commitment“, Positive Selektion

Im adulten Thymus treten die Thymozyten nahe der Medulla in den Kortex ein [41, 42]. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Gene, die für den TZR kodieren, noch in ihrer Keimbahnkonfiguration vor. Während ihrer Wanderung nach außen rearrangieren sie ihre TZR-Gene: Durch die erste Welle der RAG-Aktivität wird der β -Locus umgeordnet. Wenn dadurch eine funktionelle β -Kette entsteht, wird diese zusammen mit einer prä- α -Kette auf der Oberfläche exprimiert, was dazu führt, dass auch der α -Locus umgeordnet und die Korezeptoren CD4 und CD8 exprimiert werden. Die funktionelle Umordnung der β -Kette führt dazu, dass dieser Thymozyt proliferiert [43]. In diesem Stadium befinden sich die Thymozyten am Rand des Kortex unterhalb der Kapsel. Sie haben die Rearrangierung erfolgreich durchgeführt und exprimieren nun beide Korezeptoren, sie sind doppelt positiv ($CD4^+CD8^+$). Wenn sie in diesem Stadium spezifisch, aber mit geringer oder intermediärer Affinität an einen Peptid-MHC-Komplex auf kTEZ binden, entgehen sie dem programmierten Zelltod, schalten die RAG-Gene ab und regulieren einen der beiden Korezeptoren herunter [44, 45]. Dazu ist ein diverses Peptid-Repertoire erforderlich [46, 47, 48]. Thymozyten interagieren während der positiven Selektion vermutlich mit nur einer einzigen kTEZ [49]. Wenn die Thymozyten einen ihrer Korezeptoren herunterregulieren, kehrt sich ihre Wanderungsrichtung um und sie wandern von der subkapsulären Zone nach innen. Nicht klar ist, was letztlich zur Abschaltung eines Korezeptors führt. Diskutiert werden zwei Modelle: Das instruktive Modell sieht vor, dass die Bindung des TZR an den Peptid-MHC-Komplex und die gleichzeitige Bindung des passenden Korezeptors (CD4, falls der TZR an einen MHC Klasse II-Komplex bindet, CD8, falls er an einen MHC Klasse I-Komplex bindet) die Differenzierung in Richtung dieses Wegs fördert. Das „stochastische“ Modell propagiert, dass die Expression eines Korezeptors zufällig abgeschaltet wird, so dass die Zellen zugrunde gehen, die einen Korezeptor exprimieren, der nicht geeignet ist, an den MHC der Klasse zu binden, an den der TZR binden könnte. Nach etwa zehn Tagen verlassen die Thymozyten den Kortex und stellen sich dem nächsten Kontrollpunkt: der negativen Selektion [17].

1.3.4 Zentrale Toleranz und negative Selektion

Zentrale Toleranz wird im Thymus durch die negative Selektion, die Induktion von Anergie und die Induktion regulatorischer T-Zellen vermittelt. Die negative Selektion entfernt T-Zellen aus dem Repertoire, die mit hoher Affinität an körpereigene Peptide binden würden [50, 51, 52, 53, 54]. Um möglichst viele autoreaktive Thymozyten ausmerzen zu können, müssen möglichst viele Antigene, die im Körper auftreten können, ständig im Thymus präsentiert werden.

1.3.4.1 Beteiligte Zelltypen

Wo zentrale Toleranz induziert wird, war lange Zeit umstritten. Es scheint inzwischen klar, dass bereits im Kortex $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten, die mit hoher Affinität an Peptid-MHC-Komplexe auf mTEZ binden, deletiert werden. Der Hauptteil der negativen Selektion geht aber offenbar in der Medulla durch Deletion vonstatten [55, 56, 57].

Welcher Zelltyp für die negative Selektion verantwortlich ist, ist ebenfalls umstritten. Die Medulla beinhaltet eine Vielfalt von Zellen, die dazu in der Lage sind, Antigen zu präsentieren. Am effektivsten sind dabei die dendritischen Zellen des Thymus (tDC), die im Gegensatz zu unreifen dendritischen Zellen der Haut und reifen dendritischen Zellen der lymphatischen Organe sowohl effektiv Antigen aufnehmen als auch präsentieren können [58, 59]. Ferner befinden sich im Thymus auch B-Zellen, die ebenfalls professionell Antigen präsentieren können und deshalb auch an der negativen Selektion beteiligt sein könnten, und Makrophagen. Auch das medulläre Epithel erfüllt alle Voraussetzungen, um, analog zum kortikalen Epithel und der positiven Selektion, an der negativen Selektion beteiligt zu sein.

Der Einfluss der einzelnen Zelltypen kann nur indirekt bestimmt werden. Welchen Anteil die mTEZ an der negativen Selektion haben, wurde in Experimenten an Mäusen, die kein MHC auf hämatopoetischen Zellen exprimieren, aber MHC auf mTEZ besitzen, gezeigt. T-Zellen, die in diesen Tieren selektioniert worden waren, lösen bei Transfer in bestrahlte Wildtyp-Mäuse desselben Stamms keine „graft versus host“-Reaktion (GvH-Reaktion) aus [60], sind also tolerant, während T-Zellen, die in Mäusen selektioniert worden waren, die weder auf mTEZ noch auf hämatopoetischen Zellen MHC besitzen, nach Transfer in bestrahlte Wildtyp-Mäuse eine GvH-Reaktion auslösen [61]. Das bedeutet, dass die hämatopoetischen Zellen (tDC, Makrophagen, B-Zellen) nicht allein für die negative Selektion verantwortlich sind, sondern dass mTEZ zur negativen Selektion beitragen.

Es wird vermutet, dass tDC und mTEZ zueinander komplementäre, nicht überlappende Antigenrepertoires präsentieren [54]. Die tDC könnten aus dem extrazellulären Raum verbreitete Antigene aufnehmen und präsentieren und außerdem ihre eigenen Proteinsignaturen widerspiegeln („hämatopoetisches Selbst“), während die mTEZ, die Antigen nur sehr begrenzt selbst aufnehmen können, ihre eigenen Proteinsignaturen auf MHC-Molekülen präsentieren („nicht-hämatopoetisches Selbst“).

Zusammengenommen findet negative Selektion statt, indem Thymozyten in der Medulla mit hoher Affinität an Peptid-MHC-Komplexe auf Stromazellen (tDC, mTEZ, eventuell Makrophagen und B-Zellen) binden und apoptotisch werden [62]. TZR mit niedriger Affinität für einen Peptid-MHC-Komplex entgehen der negativen Selektion [64, 65, 66, 44].

1.3.4.2 „Promiscuous“ Antigenexpression

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass der Thymus zur negativen Selektion ausschließlich thymusspezifische und ubiquitäre Antigene präsentiert, und solche, die vom Blutstrom eingeschleppt werden. Für die tDC trifft das anscheinend zu. Jedoch können mTEZs Antigen nur sehr begrenzt endozytieren. Negative Selektion wäre also auf einen begrenzten Bereich ubiquitärer, thymusspezifischer, hämatopoetischer und häufiger löslicher Antigene beschränkt. Gegen Antigene, die erst später im Leben des Organismus synthetisiert werden oder nicht häufig sind, könnte keine zentrale Toleranz induziert werden.

Mit der Entwicklung neuer Mausmodelle [67, 68] und der Verbesserung der analytischen Methoden wurde jedoch klar, dass eine Vielzahl von Antigenen von mTEZ selbst exprimiert wird, sogar solche, die bis dahin als spezifisch für ein anderes Organ galten [69, 70, 71, 72, 73, 74, 68]. Im Fall des humanen C-reaktiven Proteins (hCRP) konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser Antigene in mTEZ dazu führt, dass Thymozyten gegen diese Antigene negativ selektioniert werden [73, 74, 67]. Es hat sich außerdem gezeigt, dass die Expression von Antigenen in der Medulla mit der Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen korreliert [75, 76, 77]. Die ektopische oder „promiscuous“ Expression von Antigenen, die für andere Gewebe und Organe charakteristisch sind, trägt also zum nicht-hämatopoetischen Peptid-Repertoire bei. In bisherigen Untersuchungen konnte „promiscuous“ exprimiertes Antigen auf Einzelzellebene nur in wenigen verstreuten Zellen der Medulla nachgewiesen werden. Nicht bekannt ist bislang, wie die Expression von Antigenen in wenigen, im Thymus verstreuten mTEZ zur negativen Selektion beiträgt. Denkbar ist, dass diese mTEZ Antigen an die Umgebung abgeben; dass sie es entweder durch Abgabe von Vesikeln sezernieren oder dass sie, wenn sie während des normalen „turnovers“ sterben, von Makrophagen und tDC aufgenommen werden, die dann ihre Antigene präsentieren („antigen spreading“). Wegen des geringen Vermögens, Antigen aktiv aufzunehmen, ist eine Abgabe an andere mTEZ unwahrscheinlich, so dass die tDC die Hauptlast der negativen Selektion zu tragen hätten. Diese können, wie erwähnt, Antigen für MHC Klasse II sehr effektiv aufnehmen und auf MHC Klasse I kreuzpräsentieren, so dass sich das Antigen einer seltenen ektopisch exprimierenden mTEZ weiter verbreiten, aber auch verdünnen würde.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Thymozyten während ihres 5-10tägigen Aufenthalts in der Medulla die mTEZ in ihrer Umgebung intensiv „scannen“ (serial scanning). Ein Thymozyt, der so an eine ektopisches Antigen präsentierende mTEZ bindet, würde mit einer hohen Konzentration des ektopischen Antigens konfrontiert.

Diese beiden Modelle des „serial scanning“ und des „antigen spreading“ stehen sich derzeit gegenüber. Versuche mit Tiermodellen, in denen keine Präsentation von Antigen auf hämatopoe-

tischen Zellen möglich ist, legen nahe, dass die Weitergabe von Antigen an tDC nicht essentiell für die Induktion von zentraler Toleranz ist. Dies würde für das „serial scanning“-Modell sprechen. Auch der lange Aufenthalt der Thymozyten in der Medulla ist mit diesem Modell kompatibel.

1.3.4.3 Regulation

Wie es zur ektopischen Expression von Antigenen kommt, die bislang als spezifisch für andere Gewebe gegolten haben, ist unklar, ebenso, ob die nachgewiesene Expression transient ist oder ob die Zelle sie ständig beibehält. Möglich sind zwei Modelle:

1. „Zelltyp-Mimikry“. Eine mTEZ nimmt die Eigenschaften einer Körperzelle an und exprimiert die für diese Körperzelle spezifischen Gene. Dies wäre ein Beispiel für strikte Regulation, möglicherweise macht die mTEZ Differenzierungsschritte durch, die charakteristisch für die Körperzelle wären. Die Medulla könnte ein Mosaik aus mTEZ mit verschiedenen Eigenschaften bilden. Die experimentelle Vorhersage für dieses Modell lautet, dass nur Gene, die für einen Zelltyp charakteristisch sind, in einer mTEZ exprimiert werden. Andere Gene, die für andere Zelltypen charakteristisch sind, dürften nicht gefunden werden.
2. Zufällige Expression. Durch Erhöhung der basalen Transkriptionsrate werden Gene zufällig exprimiert. Wenn diese Annahme zutrifft, sollten Antigene in einer mTEZ exprimiert werden, die charakteristisch für mehr als einen Zelltyp sind.

Genregulation findet auf verschiedenen Ebenen statt. Die klassische Sichtweise ist die, dass Gene durch das Zusammenspiel von DNS-Sequenzen (Promotor- und Regulatorsequenzen) und Proteinen (aktivierende oder reprimierende Gen-Regulatorproteine und Transkriptionsfaktoren) aktiviert oder reprimiert werden. Aber auch der Kondensationszustand des Chromatins selbst bestimmt die Genregulation - wenn auch nicht die Feinregulation. Azetylierung der Histone dekondensiert einen DNS-Abschnitt und kann dazu führen, dass abgeschaltete Gene aktiv werden. Der Azetylierungszustand wird durch Azetylasen und Deazetylasen bestimmt.

Die Azetylierung betrifft die „Verpackung“ des Genmaterials. Aber auch Modifikationen der DNS selbst können zur Änderung des Transkriptionsstatus führen. Diese Modifikationen werden vererbt und spielen eine entscheidende Rolle in der Ontogenese. Sie bestehen in der Methylierung von Cytosinen in CpG-Inseln, die im Säugetiergenom stark unterrepräsentiert sind und sich häufig in Promotorregionen und in den ersten Exons von Genen finden. Diese CpG-Inseln sind DNS-Stücke mit hohem Gehalt an Cytosin und Guanin.

Methylierung durch DNS-Cytosin-Methyltransferasen hat verschiedene Auswirkungen auf die

Genregulation. Sie verändert allgemein die Interaktionen zwischen DNA und Proteinen, was unterschiedlichste Folgen haben kann: Die Methylierung kann, wenn sie einen Promotor betrifft, direkt durch Verhinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor zur Abschaltung des Gens führen. Durch Bindung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen und Histone-Deazetylasen kann es nach Methylierung zur Kondensation und damit zur Inaktivierung des Chromatins kommen. Verallgemeinert verändert die Methylierung den Kondensationszustand des jeweiligen DNS-Abschnitts, also die räumlichen Eigenschaften der DNS. Da für die Expression der meisten Eukaryotengene eine Interaktion zwischen DNS-Sequenzen (z.B. von Enhancer-Elementen mit Promotoren) notwendig ist, die weit voneinander entfernt liegen können, und die Öffnung des Chromatins Voraussetzung für Transkription ist, kann eine Veränderung der Struktur des Chromatins dazu führen, dass sich die Transkriptionsrate steigert oder verringert. Andererseits kann die Methylierung eines Silencers dazu führen, dass Repressorproteine nicht binden können, was die Transkription ermöglicht. Die Methylierung von DNA kann also vielfältige Auswirkungen haben, je nachdem, an welcher Stelle im Gen selbst oder in der Nachbarschaft des Gens sie auftritt oder verändert wird [78, 79].

Im Zusammenhang mit ektopischer Genexpression wird eine zufällige Hypo- oder Hypermethylierung der mTEZ-DNS und/oder die Azetylierung des mTEZ-Chromatins diskutiert. Es ist z.B. von Krebszellen bekannt, dass allgemeine Hypomethylierung des Genoms, die zur Aktivierung von Transposons oder anderer parasitischer DNS-Elemente und damit zu Mutationen führt [80, 81], oder die Hypermethylierung und somit Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen die Entartung von Zellen auslösen kann [82]. Die Hypermethylierung von Genen, die gewebe-spezifische Gene reprimieren, oder der unspezifische Verlust der Methylierung könnte zur Erhöhung der basalen Expressionsrate für diese Gene und zur ektopischen Expression gewebespezifischer Gene führen [83, 84, 85, 86].

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit: Expressionsmuster „Gewebe-spezifischer“ Antigene in Thymuszellen der Maus

Bislang ist weitgehend unbekannt, welches Expressionsmuster ektopisch exprimierter Gene in mTEZ auf Einzelzellebene vorliegt. Einzelne Untersuchungen an Antigenen wie Insulin, hCRP und S100 β legen nahe, dass diese Antigene in wenigen Zellen der Medulla exprimiert werden. In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie hoch die Frequenz ektopisch exprimierender mTEZ ist, wie sie verteilt sind und wie das Antigen in ihnen vorliegt. Die Frequenz und die Verteilung

der Zellen könnten Aufschluss über die Regulation der Genexpression liefern. Stellt sich heraus, dass ektopisch exprimierende Zellen selten sind, aber stark exprimieren, während die übrigen Zellen keine ektopische Expression zeigen, ist das ein Hinweis auf striktere Genregulation. Wird gefunden, dass ektopische Expression in vielen mTEZ auf einem niedrigen oder variierenden Niveau geschieht, spricht das für einen stochastischen, nicht streng regulierten Mechanismus bzw. für die Erhöhung der basalen Transkriptionsrate. Die Frequenz der ektopisch exprimierenden Zellen könnte auch im Zusammenhang mit der Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen stehen. Bisher ist lediglich bekannt, dass die Anwesenheit und die absolute Stärke der Expression mit der Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang stehen, nicht aber, ob verschiedene bekannte Autoantigene häufiger oder seltener in mTEZ exprimiert werden, als andere Antigene. Es könnten auch Hinweise darauf gefunden werden, ob die Anzahl antigenexprimierender Zellen im Thymus hoch genug ist, um potentiell ein „serial scanning“ durch Thymozyten zu erlauben.

Weitere Hinweise könnten gewonnen werden, wenn gezeigt wird, welche Antigene individuelle mTEZ gleichzeitig exprimieren. Möglicherweise bildet eine mTEZ nur ein Antigen oder nur bestimmte Antigene, die spezifisch für einen Zelltyp sind. Dies würde dafür sprechen, dass die Medulla aus einem Mosaik von mTEZ besteht, die die Eigenschaften von Zellen anderer Gewebe angenommen haben und relativ wenige Antigene mit hoher Dichte auf ihrer Oberfläche präsentieren, und wäre ein Hinweis auf strikte Regulation. Bildet eine mTEZ Antigene verschiedener Herkunft, spräche dies für einen zufälligen Mechanismus.

Aus der intrazellulären Verteilung der Antigene könnte Aufschluss über die Synthese- und die potentiellen Sekretionswege gewonnen werden. Fraglich ist, ob mTEZ ektopische Antigene in genau derselben Weise synthetisieren und prozessieren, wie es die entsprechenden Körperzellen tun. In bezug auf das Modell des „antigen spreading“ wäre denkbar, dass sich das Antigen in Vesikeln anreichert, die abgestoßen und von tDC und Makrophagen aufgenommen und präsentiert werden. Eine intrazelluläre Verteilung, die der der Körperzellen gleicht, wiese dagegen darauf hin, dass Antigen auf MHC Klasse I- und II-Molekülen präsentiert werden würde.

Um Aufschluss über die ektopische Genexpression, also die Transkription, die Proteinsynthese und die Präsentation der Antigene auf Einzelzellebene zu erhalten, wird die Fragestellung in drei Schritte geteilt:

mRNA	Mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung wird nach Transkripten bestimmter Gene gesucht, von denen bekannt ist, dass sie in der Medulla des Thymus exprimiert werden [69].
Protein	Die Genprodukte bestimmter Gene werden mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz nachgewiesen.
Funktionell	Wenn Genprodukte nachgewiesen werden können, wird überprüft, ob medulläre Epithelzellen diese effektiv T-Zellen präsentieren können.

Auf mRNA-Ebene sollte direkt die Transkription der beteiligten Gene nachgewiesen werden. Der Nachweis von mRNA ist der direkte Hinweis dafür, dass Genaktivität vorliegt oder bis vor sehr kurzer Zeit vorgelegen hat, da mRNA kurzlebig ist und somit Einblicke in die aktuelle Genaktivität bietet. mRNA kann mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden.

Da nicht zwingend auch Translation stattfindet, wenn mRNA vorhanden ist, wird nach den Proteinprodukten der ektopisch exprimierten Gene gesucht. Die Detektion von Protein hat noch einen weiteren Vorteil: Im Gegensatz zum Nachweis von mRNA, die immer im Zytoplasma vorliegt, kann durch den Nachweis von Proteinen untersucht werden, ob das intrazelluläre Expressionsmuster der Proteine mit dem übereinstimmt, das von Zellen bekannt ist, die typischerweise das Protein exprimieren. Die Anwesenheit von Protein besagt nicht, wo und wie das Protein präsentiert wird. Interessant ist, ob mTEZ ektopisch exprimiertes Protein selbst effektiv im Kontext von MHC-Molekülen präsentieren können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, falls nicht besonders aufgeführt, von Merck bezogen.

2.1.2 Puffer und Lösungen

PBS

150 mM NaCl
7 mM Na₂HPO₄
3 mM NaH₂PO₄

FACS-Puffer

5% Fötale Kälberserum (FKS)
0,1 % EDTA
in PBS

DEPC-Wasser

Deionisiertes Wasser wurde über Nacht mit 0,1% (v/v) DEPC gerührt und anschließend autoklaviert.

Azetatpuffer

50 mM Natriumazetat, pH 5,0 in H₂O

AEC-Chromogenlösung

AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Sigma), 20 mg in
2,5 ml Dimethylformamid (Sigma) lösen,
47,5 ml 50 mM Azetatpuffer, pH 5,0, zugeben und die Lösung filtrieren (25µm Filter), bis sie klar ist. H₂O₂ 30%, 25,0 µl unmittelbar vor Gebrauch zugeben

TAE-Puffer

40 mM Tris/Azetat
1 mM EDTA
pH 7,5

TELT-Puffer

50 mM Tris/HCl (pH 8)
2,5 M LiCl
62,5 mM EDTA
0,4 % Triton X-100

Collagenase-Gebrauchslösung

0,2 mg/ml Collagenase IV (160 U/mg)
20 mM HEPES
2% FKS (v/v)
in PRMI 1640 Medium
pH 7,3

Collagenase/Dispase-Gebrauchslösung

0,2 mg/ml Collagenase IV (160 U/ml)
0,2 mg/ml Dispase (Grade I)
25 µg/ml DNase
Aprotinin (12 TIU/mg prot.)
20 mM HEPES
pH 7,3

Trypsin-Gebrauchslösung

0,05% Trypsin
0,5 M EDTA
0,3% BSA
50 µg/ml DNase
in PBS, pH 7,3

2.1.3 Zellkulturmedien

Alle Ausgangsmaterialien wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, von der Firma Gibco/Life Sciences bezogen.

T-Zell-Medium

Iscoves Medium
10% fötales Kälberserum
10 mM Hepes pH 7,3
2 mM Glutamin
50 µM 2-Mercaptoethanol
50 µg/ml Streptomycin
50 U/ml Penicillin

Sato-Medium

DMEM (4500 mg/ml Glukose)

1% Pferdeserum

1 µg/ml Transferrin

10 µg/ml Insulin (Sigma)

100 µg/ml Putreszin (Sigma)

200 nM Progesteron (Sigma)

500 pM Tri-Iodthyronin (Sigma)

220 nM Natriumselenit (Sigma)

520 nM L-Thyroxin (Sigma)

25 µg/ml Gentamycin

Nach Zugabe aller Zusätze wurde das Medium sterilfiltriert (0,22 µm Filter).

RPMI-Medium

RPMI 1640

5% Fötales Kälberserum

10 mM Hepes pH 7,3

2 mM Glutamin

50 µg/ml Streptomycin (Gibco)

50 U/ml Penicillin (Gibco)

Serumfreies Medium

HL-1 Medium (Hycor)

mit den gleichen Zusätzen wie T-Zell-Medium, aber ohne FKS

Einfriermedium

63% Kulturmedium

25% FKS

12% DMSO (Sigma)

2.1.4 Medien für Bakterien

TB-Medium

12 g Bacto-Trypton

24 g Hefe-Extrakt

4 ml Glycerin

ad 900 ml H₂O, autoklavieren

Vor der Benutzung wurden 100 ml Phosphatpuffer (0,17 M K₂HPO₄; 0,72 M KH₂PO₄) steril zugegeben.

LB-Platten

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

15 g Agar

ad 100 ml H₂O, autoklavieren und nach Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml) in Petrischalen aliquotieren.

SOC-Medium

20 g Bacto-Trypton

5 g Hefe-Extrakt

0,5 g NaCl

10 ml 250 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM Glukose

ad 1000 ml H₂O, autoklavieren

2.1.5 Antikörper

Antigen	Klon	Spezies/Isotyp	Konjugat	Referenz/ Firma
S100β, human		Kaninchen, Serum	-	Dako
Somatostatin- 28, human		Kaninchen, Serum	-	Serotec
Insulin, Schwein		Meerschwein- chen, Serum	-	Dako
MOG	8.18C5	Maus IgG	-	AG Trotter [89]
PLP	O10	Maus IgM	-	AG Trotter [90]
P1A		Kaninchen Serum		[91]
Maus μ-Kette		Ziege, Serum	POD	Southern Bio- technology
Maus μ-Kette		Ziege, Serum	Cy5	Southern Bio- technology
Kaninchen IgG (H+L)		Ziege	Cy3	Dianova
Maus Fc- Rezeptor II	2.4G2	Ratte IgG		[92]
Kaninchen IgG (H+L)		Esel, F(ab') ₂ - Fragment	POD	Dianova, Hamburg
Meerschwein- chen IgG (H+L)		Ziege, F(ab') ₂ - Fragment	POD	Dianova. Hamburg
Digoxigenin		Schaf, F(ab') ₂ - Fragment	AP	Roche, Mann- heim
Maus IgG (H+L)		Ziege, F(ab') ₂ - Fragment	POD	Dianova Ham- burg
Meerschwein- chen IgG(H+L)		Ziege	Biotin	Dianova, Hamburg
FITC		Maus IgG	magnetische Beads	Miltenyi, Köln

Antigen	Klon	Spezies/Isotyp	Konjugat	Referenz/ Firma
kortikales + medulläres Epithel	G8.8	Ratte IgG	FITC	[37]
kortikales Epi- thel	CDR1	Ratte IgG	Biotin	[38]
Dendritische Zellen, CD11c	N418	Ratte	FITC	[93]
Maus CD45		Ratte IgG	PE	Dianova, Hamburg

Streptavidin-Red⁶⁷⁰ (Gibco)

UEA-1-FITC (Sigma)

2.1.6 Verwendete Bakterien

Escherichia coli TOP10

2.1.7 Tiere

Mäuse der Stämme C57Bl/6, C3H und SJL/J wurden von Charles River WIGA (Sulzbach) bezogen. Die PLP-transgenen Mäuse stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Armin Nave [94], die hCRP-transgenen Mäuse von Prof. Dr. Ulrich Rüther [95].

Die Tiere wurden im Tierhaus des DKFZ unter SPF-Bedingungen gehalten.

2.1.8 Primer für die Genotypisierung

2.1.8.1 hCRP-Primer

Bezeichnung	Sequenz
hCRP 2	CCATGGAGAAGCTGTTGTG
hCRP 3	CTGTGACTTCAGGAACCTC
hCRP 1	CAAATGTGTACTGGAGCTAC

Größe der RT-PCR-Produkte in Basenpaaren:

hCRP 2 / hCRP 1	348
hCRP 2 / hCRP 3	326

genomische DNA jeweils + 258

2.1.8.2 PLP

Bezeichnung	Sequenz
PLP 3'	CCATACATTCTGGCATCAGC
PLP 5'	ACTACAAGACCACCATCTGC
Neo	GGGGATCGGCAATAAAAAGAC

Größe der RT-PCR-Produkte in Basenpaaren:

Wildtyp-Bande: ca. 150
 KO-Bande: ca. 450

Sämtliche Primer wurden von Herrn Wolfgang Weinig von der Oligo-Sequenzierungsgruppe des DKFZ synthetisiert und über HPLC aufgereinigt.

2.1.9 Peptide

Sämtliche Peptide wurden von Herrn Pipkorn im DKFZ hergestellt.

Verwendungszweck	Sequenz
Somatostatin-28 Blockierungspeptid für die Immunhistologie	SANSNPRAMAPRERK
PLP Peptid 139 bis 151, Immunisierung von SJL-Mäusen, Gewinnung und Haltung von T-Zell-Linien	CHCLGKWLGHDPK
PLP Peptid #1, Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen, Gewinnung und Haltung von T-Zell-Linien	CLVGAPFASLVA
PLP Peptid #11, Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen, Gewinnung und Haltung von T-Zell-Linien	PVYIYFNTWTTC

Verwendungszweck	Sequenz
PLP Peptid #13, Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen, Gewinnung und Haltung von T-Zell-Linien	RMYGVLPWNAFP
PLP Peptid #15, Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen, Gewinnung und Haltung von T-Zell-Linien	LFIAAFVGAAAT

2.1.10 Puffer und Lösungen für die *in situ*-Hybridisierung

Paraformaldehyd

4% Paraformaldehyd in PBS, pH 8,0

SSPE 20x

3,6 M NaCl

0,2 M NaH₂PO₄

20 mM EDTA

in H₂O

Einstellen von pH 7,4 mit 10 M NaOH, Zugabe von 0,1 % (v/v) DEPC, über Nacht rühren lassen, autoklavieren.

dPBS

150 mM NaCl

7 mM Na₂HPO₄

3 mM NaH₂PO₄

Rühren über Nacht mit 0,1 % (v/v) DEPC, autoklavieren.

Proteinase K-Puffer

500 µg/ml Proteinase K

in 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.4

TEA-Puffer

0,1 M Triethanolamin

1 mMol/L MgCl₂

Puffer 1

100 mM Tris-HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl

Blockierungspuffer

0,05 g Blockierungsreagenz (Roche)
in 10 ml Puffer 1

Puffer 2

100 mM Tris-HCl (pH 9.5)
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂
0,1 % (v/v) Tween
2 mM Levamisol (Sigma)

SSC 20x

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7.2

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5
1 mM EDTA

Hybridisierungspuffer

5 g Blockierungsreagenz (Roche)
250 ml Formamid
125 ml 20x SSC
500 mg Hefe tRNA (Roche)
1 h bei 65° rühren, dann weiter zugeben:
110 ml DEPC-H₂O
1 ml Heparin (50 mg /ml)
2,5 ml Tween 20
5 ml CHAPS (10% Stocklösung)
5 ml EDTA (0,5 M Stocklösung)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

2.2.1.1 PLP

Zur Detektion von PLP wurden folgende Antisense-DNA-Sonden hergestellt (DNA-Synthese, im Hause):

#1: 5'-CGAGAGTGACCATGTCT-3' (Exon 2)

#2: 5'-CGTCAGAGACGCG-3' (Exon 4)

Die korrespondierenden Sense-Sonden sind:

#1: 5'-GCTCTCACTGGTACAGA-3' (Exon 2)

#2: 5'-GCAGTCTCTGCGC-3' (Exon 4)

Die Sonden sind auch in der DM20-Variante vorhanden.

Sie wurden mit dem „DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit“ von Roche, Mannheim, mit Digoxigenin markiert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.2 hCRP

Drei Fragmente der hCRP DNA wurden in einen pSK-Vektor (Stratagene, La Jolla, CA) subkloniert. Es wurden folgende Fragmente verwendet:

#1: vom 5'-Ende zur HincII-Schnittstelle an Position 218

#2: ein ApaI-Fragment zwischen Position 813 und 1301

#3: ein ApaI / EcoRI-Fragment zwischen Position 1301 und 1563.

Zur Herstellung von Sonden wurden die Plasmide linearisiert. Dazu wurden Restriktionsverdauungen im jeweiligen, vom Hersteller der Endonukleasen bezogenen Puffer durchgeführt. Es wurden 1-5 U Enzym auf 1 µg DNS eingesetzt und für 2 bis 4 Stunden inkubiert. Mit den so linearisierten Plasmiden wurden *in vitro* Run-Off-Transkriptionen durchgeführt, während derer sie mit Dig-UTP markiert wurden. Dazu wurde das „Digoxigenin RNA Labeling Kit“ von Roche (Mannheim) verwendet. Die Antisense-Sonden wurden zur Verwendung gepoolt.

2.2.1.3 S100β

Ein 457 bp langes Stück des Exon 3 von S100β wurde kloniert (Position 7668 bis 8118, MMS100B, [87]) und weiter in einen pSK-Vektor (Stratagene) einkloniert. Es wurden folgende Fragmente verwendet:

#1: vom 5'-Ende bis zur XbaI-Schnittstelle an Position 7917

#2: vom 5'-Ende bis zur Hind III-Schnittstelle an Position 7941

Zur Linearisierung wurde mit XbaI / Xho oder mit BamHI / HindIII (210 nt) wie oben beschrieben geschnitten und mittels *in vitro* Run-Off-Transkription Dig-markierte RNA gewonnen.

2.2.1.4 Insulin

Dig-markierte Insulin-Sonde wurde von Ruth Ganss (DKFZ) zur Verfügung gestellt. Die Sonden wurden nach Mulder und Sundler [88] hergestellt (persönliche Kommunikation). Obwohl diese Sonden für die Detektion von Insulin in der Ratte konzipiert sind, konnten sie verwendet werden, da die verwendeten Sequenzen identisch mit denen in der Maus sind.

2.2.2 *in situ*-Hybridisierung

Die Präparate wurden aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Sie wurden für 20 min in 4% Paraformaldehyd in PBS refixiert, dann in 2x SSPE gewaschen und für 30 min bei 37°C in Proteinase K-Lösung inkubiert, um die Zellwand zu permeabilisieren. Anschließend wurden sie in 2x SSPE gewaschen, für 15 min bei RT in 0,2M HCl angesäuert und dann nochmal in 2x SSPE gewaschen. Dann wurden die Objektträger in TEA-Puffer überführt und für 10 min bei RT inkubiert. Dabei wurde die Lösung mit einem kleinen Rührfisch langsam in Bewegung gehalten. Zum TEA-Puffer wurde am Anfang und nach 5 min 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid zugesetzt. Anschließend wurde in 2x SSPE gewaschen. Die Objektträger wurden dann kurz in DEPC-Wasser getaucht. Die Feuchtigkeit wurde um das Objekt herum abgetupft und das Objekt mit einem Fettstift umkreist. Das Objekt wurde dann mit Hybridisierungspuffer ohne Sonde bedeckt und dann in einer feuchten Kammer (angefeuchtet mit Formamid und SSPE, je 50%) drei Stunden lang bei 60°C vorhybridisiert.

Nach Abschluss der Vorhybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer abgegossen. Währenddessen wurde der Hybridisierungspuffer mit der Sonde (1µg/ml) vorbereitet und für 2 min auf 95°C erhitzt, um sie zu denaturieren. Ein zerbrochenes Deckglas wurde auf jede Seite des Objekts gelegt, der Hybridisierungspuffer mit der entsprechenden Sonde aufgetragen und das Objekt mit einem weiteren Deckglas bedeckt. In einer abgeklebten feuchten Kammer wurden die Objekte bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur über Nacht inkubiert.

Nach Abschluss der Hybridisierung wurden die Objektträger in 2x SSPE gewaschen, bis die Deckgläser abfielen. Die Objekte wurden mit Hybridisierungspuffer ohne Sonde bedeckt und 10 min bei RT inkubiert. Der Puffer wurde dann durch eine Mischung aus Hybridisierungspuffer und 2x SSPE (je 50%) ersetzt, zu der 0,3% (v/v) CHAPS (aus der 10%igen Stocklösung) zugesetzt wurden. Damit wurden die Objekte weitere 10 min inkubiert. Es folgte eine 30minütige Inkubation mit 2x SSPE und 0,3% CHAPS (aus der 10%igen Stocklösung) und dann eine weitere 30minütige Inkubation mit 2x SSPE ohne Zusätze. Dann wurden die Objektträger in 2x SSPE mit 0,02µg/ml RNase H inkubiert, um freie Sonde zu entfernen. Es folgte ein stringenter Waschschrift in Formamid/2x SSPE (je 50%) bei 50°C für 2 Stunden. Dann wurden die Objekte für 10 min mit 2x SSPE mit 0,3% CHAPS (aus der 10%igen Stocklösung) inkubiert. Dann folgte die Detektionsphase: Die Objekte wurden 2 x 10 min mit Puffer 1 gewaschen. Dann wurden sie mit Blockierungspuffer bedeckt und 30 min bei RT inkubiert. Der Blockierungspuffer wurde abgegossen und der 1:500 verdünnte Detektionsantikörper (α -Digoxigenin-AP, F(ab')₂-Fragment) eine Stunde lang mit den Objekten inkubiert. Dann wurden die Objekte drei-

mal 5 min lang mit Puffer 1 gewaschen, anschließend noch 10 min in Puffer 3, um endogene Alkalische Phosphatasen zu inhibieren. Dann wurden die Objektträger mit NBT/BCIP-Substratlösung (BM Purple, präzipitierend, Roche) bedeckt und über Nacht, höchstens aber für drei Tage, bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, bis eine Farbreaktion zu erkennen war. Die Reaktion wurde durch Inkubation in TE-Puffer (5 min) gestoppt und das Objekt in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.3 Präzipitation von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit der 2,5fachen Menge Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Azetat (pH 5,2) versetzt und für mindestens eine Stunde bei -20°C gehalten. Anschließend wurden die ausgefallenen Nukleinsäuren durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 30 min, 13000 U/min) pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet kurz getrocknet und in Wasser gelöst.

2.2.4 Phenolextraktion

Um Proteinkontaminationen aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde die Lösung im Verhältnis 1:2 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und geschüttelt. Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt (5 min, 13000 U/min, Eppendorf-Tischzentrifuge) und die wässrige obere Phase abgenommen. Diese Prozedur wurde nochmal wiederholt. Anschließend wurde zweimal anstatt des Trimixes mit reinem Chloroform extrahiert und die Nukleinsäuren wie oben beschrieben mit Ethanol präzipitiert.

2.2.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die optischen Dichten der Nukleinsäurelösung wurden bei 260 und 280 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt. Die Konzentration der Ausgangslösung wurde wie folgt rechnerisch bestimmt:

Doppelsträngige DNA: $\text{Konz (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 0,05 + \text{Verdünnungsfaktor}$

Einzelsträngige RNA: $\text{Konz (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 0,04 + \text{Verdünnungsfaktor}$

Oligonukleotide: $\text{Konz (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 0,033 + \text{Verdünnungsfaktor}$

2.2.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Es wurden 1%ige horizontale Agarosegele in einem Volumen von 100 ml eingesetzt. 100 g Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 2 µl Eth-

idiumbromidlösung (10 mg/ml, Sigma) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 60 bis 100 Volt durchgeführt. Die Auftrennung der DNA wurde auf einem UV-Tisch kontrolliert und videotechnisch dokumentiert.

2.2.7 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA zur Sondenherstellung

Ein Aliquot kompetenter Bakterien (200 µl) wurde bei RT aufgetaut. Nach Zugabe von 10 µl des Plasmids wurde es 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock von 30 s bei 42°C gegeben, der sogleich auf Eis beendet wurde. Schließlich wurde 0,8 ml SOC-Medium zugesetzt und die Suspension 1 h lang bei 37°C geschüttelt. Aliquots von 100 µl wurden auf LB-Platten gestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8 Plasmid-Präparation

Über Nacht bildeten die ausgestrichenen transformierten Bakterien Einzelkolonien, die mit einer sterilen 200 µl-Pipettenspitze aufgenommen und in 2 ml LB-Medium überführt werden konnten. Darin wurde die Spitze mit den anhaftenden Bakterien bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 1,5 ml der Bakterienkultur abgenommen und pelletiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13000 U/min, 5 min). Das Sediment wurde in 200 µl TELT-Puffer aufgenommen und mit 20 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Anschließend wurde die Suspension 3 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Dann wurde sie erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem Zahnstocher oder einer Pipettenspitze entfernt und der Überstand mit 100 µl Isopropanol vermischt. Es wurde 5 min auf Eis inkubiert, um die DNA zu präzipitieren. Die DNS wurde dann sedimentiert („Präzipitation von Nukleinsäuren in wässriger Lösung“ auf Seite 34), mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 50 µl Wasser gelöst.

Um größere Mengen Plasmid zu gewinnen, wurde das „Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) verwendet. Es wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren.

2.2.9 Isolierung von DNA zur Genotypisierung

Ein etwa 0,5 cm langes Schwanzstück oder ein äquivalentes Gewebestück wurde über Nacht bei 55°C in 750 µl Lysepuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 mg/ml Proteinase K, 1% SDS) inkubiert. Am nächsten Tag wurde 250 µl gesättigte NaCl-Lösung (5 M NaCl) zu dem Lysat gegeben und 5 min geschüttelt, um Proteine zu fällen. Diese wurden durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 13000 U/min, 5 min) sedimentiert und 750

µl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Mit 500 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und nach 5 min Schütteln wie oben durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde es getrocknet, in Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.10 Amplifizierung von spezifischen Sequenzen aus genomischer DNA mittels PCR zur Genotypisierung

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Robocycler von Stratagene in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl. Der Reaktionsansatz (20 ng genomische DNA, je 200 nM Primer, Red-Taq-PCR-Puffer (Sigma) und Red-Taq (1 U pro Ansatz) nach Angaben des Herstellers, je 0,2 mM dNTPs) wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und für 3 min bei 93°C denaturiert. Anschließend wurden 35 PCR-Zyklen durchgeführt, wobei sich ein Zyklus aus Denaturierung (1 min, 93°C), Hybridisierung der Primer an die DNA (1 min, 58°C) und Synthesephase (2 min 72°C) zusammensetzte. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert.

2.2.11 Isolierung von Thymuszell-Populationen

20 - 40 6-8 Wochen alte Mäuse wurden mit CO₂ getötet und ihre Thymi unblutig entnommen. Sie wurden direkt nach der Entnahme in RPMI 1640-Medium mit 2% FKS auf Eis gehalten. Nach Entnahme aller Thymi wurden sie auf einer sterilen Kompresse mit zwei gebogenen Pinzetten gesäubert und von anhaftenden Fett- und Bindegewebsresten befreit. In einer Petrischale ohne Medium wurden sie dann mit zwei gebogenen Scheren zerkleinert, bis sich ein homogener Gewebepbrei gebildet hatte. Dieser wurde in einen 25ml-Erlenmeyerkolben überführt, in den zuvor ein kleiner Rührfisch gegeben wurde, und mit 10ml Medium auf Eis für 10 min langsam gerührt, um die Thymozyten aus dem Gewebe zu spülen. Der Überstand wurde anschließend in ein 50ml-Röhrchen überführt und durch einen 60 µm-Gazefilter filtriert, um Kapselgewebe zu entfernen. Der Überstand enthielt Thymozyten unterschiedlicher Stadien und wurde verworfen oder gegebenenfalls zur FACS-Analyse aufbewahrt.

Das zurückgebliebene Gewebe im Erlenmeyerkolben wurde mit 10-15 ml Collagenase-Mix 15 min lang bei 25°C im Wasserbad gerührt. Der Überstand wurde anschließend in ein 50 ml-Röhrchen überführt, durch einen 60 µm-Gazefilter filtriert, mit FKS-freiem RPMI-Medium aufgefüllt und abzentrifugiert (Hettich Rotanta, 800U/min, 3 min). Dadurch wurden die in dieser Fraktion angereicherten Rosetten sedimentiert. Der Überstand (Medium und aufschwimmende Thymozyten) wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in FKS-freiem Medium

aufgenommen, woraufhin es bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt wurde. Diese Prozedur wurde je nach Zustand des Gewebes und nach Schwerpunkt der Aufarbeitung ein- bis dreimal bei 30°C wiederholt und die gesamte Rosettenfraktion in 5 ml FKS-freiem Medium auf Eis gesammelt.

Anschließend folgten zwei oder drei Inkubationen mit Collagenase/Dispase-Mix für je 25 min bei 35°C. Reste des Gewebes wurden danach bei 37°C mit Trypsin-Lösung weiterverdaut (zweimal 30 min). Nach Beendigung des jeweiligen Inkubationsschritts wurde der Überstand durch 60 µm-Gazefilter filtriert, die Zellen wurden in ein 50 ml-Röhrchen überführt, ad 50 ml mit FKS-haltigem Medium aufgefüllt und bei 1200 U/min (Hettich Rotanta) für 5 min zentrifugiert.

Um die Rosettenfraktion weiter anzureichern, wurde in ein 50 ml-Röhrchen 20 ml FKS (zuvor durch Zentrifugation von Präzipitaten gereinigt) blasenfrei vorgelegt und die Rosettenfraktion vorsichtig aufgeschichtet. Das Röhrchen wurde senkrecht ins Eis gestellt. Nach 5 min wurde kontrolliert, ob sich Rosetten, erkennbar als leichte Trübung im FKS, nach unten absetzen. Nach 30 min wurde das Medium und die Interphase, die vor allem Thymozyten enthalten sollten, abgenommen und zur Kontrolle in ein neues Röhrchen überführt. Das verbliebene FKS, in dem sich die Rosetten angereichert haben sollten, wird abzentrifugiert (Hettich Rotanta, 800 U/min, 3 min), das Sediment anschließend in 1 ml FKS-freiem Medium aufgenommen und die Rosetten ausgezählt. Bei schlechter Anreicherung wurde ein weiterer Gradient auf diese Weise geschichtet, wobei nur noch 12 ml FKS in einem 15 ml-Röhrchen verwendet wurde. Die Rosetten wurden nach erfolgreicher Anreicherung bis zum Ende der kompletten Aufreinigung in FKS-freiem Medium auf Eis gelagert.

Die Überstände der Collagenase/Dispase- und der Trypsin-Verdaus wurden in FKS-haltigem Medium zusammengeführt und nach Beendigung der Verdaus zweimal mit FKS-freiem Medium gewaschen. Für die nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation wurden aus einer Percoll-Stocklösung (1 ml 10 x RPMI, 9 ml Percoll, Pharmacia) mit der Dichte $\rho = 1,117$ und aus FKS-freiem RPMI 1640 drei Lösungen mit den Dichten 1,03; 1,045 und 1,07 gemischt. Das Zellsediment, das dem Gradienten unterworfen werden sollte, wurde in der dichtesten Lösung aufgenommen. Der Gradient wurde aufgebaut, indem jeweils 6ml Percoll/RPMI ($\rho = 1,07$), 6 ml Percoll/RPMI ($\rho = 1,045$), 6 ml Percoll/RPMI ($\rho = 1,03$) und 3 ml FKS-freies RPMI mit einer Pasteurpipette übereinander geschichtet wurden. Der Gradient wurde 30 min lang bei 3500g und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Es bildeten sich drei Interphasen aus. In der Interphase 1 und 2 und weniger stark angereichert, aber dennoch zahlreich, auch in Interphase 3, sammelten

sich die Epithelzellen, die mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgezogen wurden. Sie wurden in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit FKS-haltigem Medium aufgefüllt und 8 min bei 1600 U/min sedimentiert. Das Sediment wurde in 5 ml FKS-haltigem Medium aufgenommen, die Zellen ausgezählt und auf Eis gelagert.

2.2.12 Anreicherung von Epithelzellen im FACS

Die Epithelzellfraktion wurde abzentrifugiert, das Sediment resuspendiert und mit dem monoklonalen Antikörper 2.4G2 (α -Fc-Rezeptor II) inkubiert. Nach 10 min auf Eis wurde mit 10 ml FACS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem G8.8 (1:100) 15 min auf Eis inkubiert, dann gewaschen und mit PE-konjugiertem α -CD45 (1:100) für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift, eine 15minütige Inkubation auf Eis mit CDR1-Biotin (1:200) und nach einem weiteren Waschschrift eine 15minütige Inkubation auf Eis mit Streptavidin-Red⁶⁷⁰ (1:150). Abschließend wurden die Zellen gewaschen und durch einen 60 μ m-Gaze-Filter filtriert. Kontrollen und Einzelfärbungen wurden ebenfalls durchgeführt.

Die Anreicherung erfolgte im FACS (FACS-Vantage Plus Cell Sorter, Becton Dickinson Heidelberg). Zwei Populationen wurden sortiert: Die kortikalen Epithelzellen zeichneten sich durch den Phänotyp $CD45^{-/lo}CDR1^{+}G8.8^{+}$ aus, medulläre Epithelzellen sind $CD45^{-/lo}CDR1^{-}G8.8^{+}$. Die Populationen wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße sortiert, in die FACS-Puffer vorgelegt wurde. Reanalysen zeigten, dass die Populationen zu 98% rein sind.

2.2.13 Anreicherung medullärer Epithelzellen per MACS

Die Epithelzellfraktion wurde abzentrifugiert und das Sediment in 1 ml α -Fc-Rezeptor-Überstand 2.4G2 resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurde mit 10 ml FACS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem UEA-1 (Sigma, 1:300) 15 min auf Eis inkubiert und anschließend gewaschen. Nach Angaben des Herstellers wurde eine der Zellzahl angemessene Verdünnung der α -FITC-Microbeads (Miltenyi) hergestellt und damit das Zellpellet resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min bei 8-10°C inkubiert und dann gewaschen. Währenddessen wurde eine Säule (MS+, Miltenyi) nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und durch einen 60 μ m-Gaze-Filter filtriert. Dann wurden sie auf die Säule gegeben, die nach dem Durchlaufen der Zellsuspension dreimal mit FACS-Puffer gewaschen wurde. Die magnetisch markierten Zellen wurden nach Herstellerangaben eluiert und nochmals über eine frische Säule gegeben. Reanalysen zeigten, dass die Anreicherung nach der zweiten Säule mindestens 95%, meist 98% beträgt.

2.2.14 Gewinnung der Makrophagen und DC aus der Rosettenfraktion

Die Rosettenfraktion, die während des weiteren Verdaus auf Eis gelagert wurde, wurde abzentrifugiert (Hettich Rotanta, 1200 U/min, 5 min), das Zellpellet in 1 ml 25mM EDTA in PBS aufgenommen und 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die Rosetten zu dissoziieren. Daraufhin wurden die Zellen mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette vereinzelt und das Ergebnis unter dem Mikroskop kontrolliert. Wenn die Vereinzellung erfolgreich war, wurden die Zellen mit FACS-Puffer aufgefüllt, abzentrifugiert (Hettich Rotanta, 1200U/min, 5 min), 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und gefärbt.

Um die potentiellen Wechselwirkungen für spätere Färbungen möglichst zu minimieren, wurden nur die dendritischen Zellen mit FITC-markiertem N418 gefärbt (1:100, 15 min auf Eis gefolgt von einem Waschschrift). Die Makrophagen wurden anhand ihrer starken Autofluoreszenz identifiziert.

2.2.15 Präparation von Hepatozyten

Um Material für Sondentests zu gewinnen, wurden Leberzellen isoliert. Dazu wurden Föten am Tag vor der Geburt entnommen und getötet. Ihnen wurde die Leber entnommen und diese wie bei der Isolierung von Epithelzellen mit Collagenase/Dispase-Mix und Trypsin-Lösung verdaut. Die Zellsuspension wurde durch einen 60 µm-Gaze-Filter gegeben und pelletiert. Die Erythrozyten wurden durch einminütige Inkubation in Erythrozyten-Lysepuffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 100 mM EDTA) zerstört. Anschließend wurden die Hepatozyten gewaschen, gezählt und zum Zytospin weiterverarbeitet.

2.2.16 Präparation von Milzzellen

Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen unblutig entnommen und in eine Petrischale mit Medium überführt. Dort wurde sie mittels zweier gebogener Kanülen ausgestrichen und durch Pipettieren in eine Einzelzellsuspension gebracht. Die Suspension wurde durch 60 µm Gaze gefiltert und abzentrifugiert. Die Erythrozyten wurden anschließend lysiert (siehe "Präparation von Hepatozyten" auf Seite 39) und die Suspension zweimal gewaschen. Wenn die Milzzellen als Feederzellen für die Zellkultur verwendet wurden, wurden sie mit 60 Gy in einem Gammastrahler inaktiviert, nochmals gewaschen und mit Kulturmedium auf die gewünschte Dichte eingestellt.

2.2.17 Kultivierung von T-Zell-Klonen

Die Kultur erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. CD4-T-Zell-Klone wurden in Iscoves-Medium unter Zusatz von IL-2, Peptid und Feederzellen (Milzzellen) gehalten. Zum Iscoves-Medium wurden 20 U/ml IL-2 und 10 µg/ml Peptid gegeben. Die Kultur wurde in 10 ml-Zellkulturflaschen begonnen, die aufrecht hingestellt wurden, damit sich die Zellen am Boden sammeln. Zu 3 - 4 x 10⁶ T-Zellen wurden 15 x 10⁶ bestrahlte Milzzellen zugesetzt. Die T-Zellen wurden im allgemeinen alle 10 bis 14 Tage restimuliert.

2.2.18 Kultivierung sonstiger Zelllinien

Oli-neu-Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten. Sie erhielten Sato-Medium (siehe "Zellkulturmedien" auf Seite 24) und wurden trypsiniert und umgesetzt, sobald sie den Boden der Zellkulturflasche bedeckten. Das Medium wurde bei Bedarf gewechselt.

2.2.19 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen bei Bedarf abgelöst, in Medium gewaschen, in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen gefüllt. Das Röhrchen wurde schnellstmöglich in einen mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer (Nalgene) überführt, der in einem -80°C-Gefrierschrank in 1°C-Schritten von RT auf -80°C herunterkühlte. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen in einen Lagertank mit flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurde das Röhrchen dem Stickstofftank entnommen und in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten, bis der Inhalt des Röhrchens soweit angetaut war, dass er sich in ein mit Medium gefülltes 50 ml-Röhrchen transferieren ließ. Die Zellen wurden gewaschen und in ihrem Kulturmedium in eine Zellkulturflasche gegeben.

2.2.20 Generierung von T-Zell-Linien

Mäuse wurden mit 100 µg Peptid in komplettem Freund's Adjuvans (CFA) immunisiert. Dazu wurde das Peptid in 50 µl PBS aufgenommen und so lange mit 50 µl CFA durchmischt, bis sich eine Emulsion bildete. Dazu wurden zwei durch ein Zwischenstück verbundene 1 ml-Spritzen verwendet. Je 50 µl Emulsion wurden subkutan in die Fußsohlen der Hinterläufe injiziert. Nach 8-10 Tagen wurde die Maus getötet und die poplitealen und inguinalen Lymphknoten entnommen.

Die Lymphknoten wurden in PBS oder Medium überführt, von Fett- und Bindegewebe befreit und mit den rauen Seiten zweier Matrand-Objektträger, die zuvor in Ethanol sterilisiert wor-

den waren, zerrieben. Die Zellen wurden aufgenommen, durch 60 µm Gaze filtriert und gewaschen. Sie wurden sofort wie etablierte T-Zell-Kulturen behandelt, mit dem Unterschied, dass sie in 8-Loch-Platten kultiviert wurden, bis sie Zellzahlen erreichten, die die Kultivierung in einer Flasche ermöglichten. Um zu testen, ob die Zellen durch das Peptid stimuliert wurden und nicht unspezifisch proliferierten, wurde einem Aliquot der Zellen das Peptid entzogen.

2.2.21 Nachweis von Antigen-Präsentation auf Epithelzellen mit T-Zell-Linien (Proliferationsassay)

Ruhende T-Zellen wurden aus der Kultur entnommen und gewaschen. Für diesen Versuch wurde serumfreies HL-1-Medium verwendet, um unspezifische Stimulation durch Serumkomponenten zu verhindern. Die zu testenden Epithelzellen wurden möglichst in Triplikaten der gewünschten Zelldichten in 96-Loch-Platten eingesät. Zu ihnen wurden 5×10^4 T-Zellen gegeben. Als Negativkontrollen wurden Thymozyten statt der Epithelzellen eingesät und die einzelnen Zelltypen jeweils einzeln eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten peptidbeladene Milz- oder dendritische Zellen.

Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 1 µCi ^3H -Thymidin (Amersham) in 20 µl Medium gepulst. Nach Inkubation für weitere 20 Stunden wurden die Zellen mit einer Erntemaschine (MicroCell Harvester, Skatron) auf Glasfaser-Filtermatten (Skatron) übertragen. Die Matten wurden getrocknet, mit Szintillationsflüssigkeit versehen und eingeschweißt. Die Messung der eingebauten Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationszähler (Betaplate 1205, Pharmacia).

2.2.22 Immunhistochemie

2.2.22.1 Gefrierschnitte

Frisch entnommenes Gewebe wurde in TissueTek eingedeckt und in einem mit Isopentan gefüllten Gefäß, das in flüssigem Stickstoff stand, durchgefroren. Dann wurde es mit TissueTek auf den Objektisch des Kryomikrotoms (Leica CM 3050 S) geklebt. 5 µm dicke Schnitte wurden erstellt und auf Histobond-Objektträger (Marienfeld) aufgezogen. Nach dem Trocknen wurden sie in eiskaltem Azeton 15 min lang fixiert, getrocknet und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.22.2 Zytospin

Die Zellsuspension wurde in FACS-Puffer auf die gewünschte Dichte eingestellt (zwischen 10^4 /ml und 6×10^4 /ml). 300 µl der Suspension wurden in die fertig zusammengesetzten und in den Rotor eingehängten Trichter gegeben und für 3 min bei $28,6 \times g$ zentrifugiert. Anschließend

wurden die Trichter demontiert, die Objekte getrocknet, dann 10 min in eiskaltem Azeton fixiert, getrocknet und bei -20°C gelagert. Damit die Zellen sich nicht ablösen, wurden Histo-bond-Objektträger (Marienfeld) verwendet.

2.2.22.3 Immunhistochemischer Nachweis von PLP

Die Objekte wurden aufgetaut, mit Fettstift umrandet und kurz in PBS gewässert. Endogene Peroxidaseaktivität wurde, je nach Stärke der Aktivität, mit 3% (v/v) H₂O₂ in PBS für 15 min bei schwacher Aktivität oder mit 0,5% H₂O₂ in reinem Methanol für 30 min bei starker Aktivität oder sehr empfindlichem Material gequenchet. Es folgte ein Blockierungsschritt mit 3% Milchpulver, 0,5% Tween, 0,1% Gelatine und 1% Ziegen Serum für 30 min in PBS bei RT in einer feuchten Kammer. Dann wurde für 5 min in PBS gewaschen. Der Erstantikörper (O-10) wurde 1:50 in PBS verdünnt und reagierte 1 h bei RT mit dem Objekt. Nach Beendigung der Inkubation wurde in PBS gewaschen (3 x 5 min). Der Detektionsantikörper (Ziege- α -Maus μ -Kette POD) wurde 1:300 in PBS verdünnt, auf das Objekt aufgetragen und reagierte 30 min bei RT. Dann wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Auf das Objekt wurde AEC-Chromogenlösung gegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Waschen in PBS gestoppt und das Präparat in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

Die Negativkontrolle wurde durchgeführt, indem der Erstantikörper weggelassen wird (Sekundärantikörperkontrolle).

2.2.22.4 Immunhistochemischer Nachweis von S100 β

Siehe "Immunhistochemischer Nachweis von PLP" auf Seite 42, mit folgenden Variationen: Die Blockade wurde ohne Gelatine und mit 1% Esel Serum statt des Ziegen Serums durchgeführt. Der Erstantikörper wurde 1:25 verdünnt. Der Zweitantikörper (Esel- α -Kaninchen IgG(H+L) F(ab')₂-Fragment, POD) wurde 1:300 in PBS verdünnt. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde zu einem Aliquot des vorverdünnten Erstantikörpers 30 mM freies S100 β (Rind, Sigma) zugegeben und 30 min bei RT inkubiert, um die spezifische Aktivität des Antikörpers zu blockieren.

2.2.22.5 Immunhistochemischer Nachweis von P1A

Siehe "Immunhistochemischer Nachweis von PLP" auf Seite 42. Variationen: Die Blockade wurde ohne Gelatine durchgeführt. Das Ziegen Serum wurde durch 1% Esel Serum ersetzt. Der Erstantikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Der Zweitantikörper (Esel- α -Kaninchen IgG(H+L) F(ab')₂-Fragment, POD) wurde 1:300 in PBS verdünnt. Als zusätzliche Negativkontrolle diente neben der Sekundärantikörperkontrolle die komplette Färbung, bei der statt des Erstantikörpers Präimmunserum eingesetzt wurde.

2.2.22.6 Immunhistochemischer Nachweis von Somatostatin

Siehe "Immunhistochemischer Nachweis von PLP" auf Seite 42. Variationen: Die Blockade wurde mit 1% Eselserum statt des Ziegenserums durchgeführt. Der Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Der Zweitantikörper (Esel- α -Kaninchen IgG(H+L) F(ab')₂-Fragment, POD) wurde 1:300 in PBS verdünnt. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde zu einem Aliquot des vorverdünnten Erstantikörpers 30 mM freies Peptid (Somatostatin-28, 1-14) zugegeben und 30 min bei RT inkubiert, um die spezifische Aktivität des Antikörpers zu blockieren.

2.2.22.7 Immunhistochemischer Nachweis von MOG

Siehe "Immunhistochemischer Nachweis von PLP" auf Seite 42. Variationen: Der Erstantikörper wird in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Der Zweitantikörper (Ziege-a-Maus IgG (H+L) F(ab')₂-Fragment, POD) wurde 1:300 in PBS verdünnt. Als Negativkontrolle diente die Sekundärantikörperkontrolle.

2.2.22.8 Immunhistochemischer Nachweis von Insulin auf Gewebeschnitten

Gefrierschnitte wurden aufgetaut und mit Fettstift umrandet. Anschließend wurden sie kurz in PBS gewässert und für 15 min in 3%igem H₂O₂ in PBS inkubiert, um die endogene Peroxidase zu inaktivieren. Dann wurde für 30 min mit 3% Milchpulver, 0,5% Tween und 1% Ziegenserum für 30 min in PBS bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Blockierungspuffer wurde dann abgegossen und die Objekte 5 min in PBS gewaschen. Dann wurde der 1:200 in PBS verdünnte Primärantikörper auf das Objekt gegeben und für 1h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3 x 5 min in PBS gewaschen. Zur Detektion wurde der Detektionsantikörper (Ziege α -Meerschweinchen F(ab')₂-Fragment, POD) auf den Schnitt gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde nochmals 3 x 5 min gewaschen und schließlich AEC-Chromogenlösung auf das Objekt gegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Waschen in PBS gestoppt und das Objekt in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.22.9 Immunhistochemischer Nachweis von Insulin auf mTEZ

Die Objekte wurden aufgetaut, mit Fettstift umrandet und kurz in PBS gewässert. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch 30minütige Inkubation in Methanol mit 0,5% H₂O₂ inaktiviert, damit sich die Zellen nicht durch Bläschenbildung ablösen. Dann wurde 5 min in PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurde 30 min lang mit 3% Milchpulver, 0,1% Gelatine, 0,05% Tween, 2% Ziegenserum und Avidin-Reagenz aus dem Vectastain ABC-Blocking Kit (Vectorstain, zugesetzt nach Angaben des Herstellers) in PBS bei

RT inkubiert. Dann wurde die Lösung abgegossen und durch das Biotin-Reagenz aus dem ABC-Blocking Kit (Vectorstain) ersetzt, das 15 min bei RT inkubierte. Dann wurde 5 min lang in PBS gewaschen. Der Erstantikörper wurde 1:100 in PBS verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde 3 x 5 min lang in PBS gewaschen. Als Zweitantikörper wurde ein biotinylierter Ziege α -Meerschweinchen-AK verwendet, der 1:200 eingesetzt wurde. Währenddessen wurde die ABC-Verstärkerlösung (Vectorstain) nach Angaben des Herstellers angesetzt und 30 min lang bei RT inkubiert, damit sich Komplexe bilden konnten. Nach Inkubation des Zweitantikörpers wurde 3 x 10 min gewaschen und dann der vorinkubierte ABC-Verstärkerkomplex aufgetragen, der wiederum 30 min bei RT auf dem Objekt verblieb. Dann wurde 3 x 10 min in PBS gewaschen und AEC-Chromogenlösung auf das Objekt gegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Waschen in PBS gestoppt und das Objekt mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt.

2.2.22.10 PLP-Doppelfluoreszenzanalyse

Die Färbung für PLP wurde wie oben durchgeführt (siehe 2.2.22.3), mit dem Unterschied, dass die endogene Peroxidase nicht inaktiviert wurde. Es wurde mit Zusatz von 1% Ziegenserum blockiert. Der Zweitantikörper (Ziege α -Maus IgM μ -Kette Cy5) wurde 1:300 verdünnt und 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Objekt 3 x 5 min in PBS gewaschen und erneut für 15 min Blockierungspuffer aus dem ersten Blockierungsschritt auf das Objekt gegeben. Dann wurde der Erstantikörper des entsprechenden Antigens in den oben genannten Verdünnungen aufgetragen (nur P1A, Somatostatin und S100 β) und wie oben inkubiert. Es folgte ein Waschschriff (3 x 5 min PBS). Dann wurde für eine halbe Stunde mit dem Zweitantikörper (Ziege α -Kaninchen-Cy3, 1:300 in PBS) inkubiert, 3 x 5 min mit PBS gewaschen und mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt. Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgten im Dunkeln.

2.2.23 Fotografische Dokumentation mikroskopischer Präparate

Die mikroskopische Analyse der Einzelfärbungen wurde mit Mikroskopen der Firma Zeiss (Axiophot 2) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit der digitalen Kamera AxioCam (Zeiss) und der Software AxioVision (Zeiss) gemacht.

Die Doppelfärbungen wurden mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Zeiss) aufgenommen und mit der Zeiss-Software „Carl Zeiss LSM Image Browser“ analysiert.

Die Aufnahmen wurden mit „Paintshop Pro“ (JASC Software) und „Photoshop“ (Adobe) ins TIFF-Format umgewandelt und gegebenenfalls geschnitten.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von Thymuszell-Populationen

Ziel der Arbeit war, auf Einzelzellebene die Expressionsmuster verschiedener Antigene auf Thymuszell-Populationen zu untersuchen. Dabei sollte die Frequenz und Ko-Expressionsmuster dieser Antigene bestimmt werden. Diese Untersuchungen wurden an Einzelzellsuspensionen von isolierten Thymuszell-Populationen durchgeführt, die per Zytospin auf Objektträger aufgebracht wurden. Das hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu Thymus-Gefrierschnitten, die aus vielen verschiedenen Zelltypen bestehen, nur eine definierte Population untersucht wird. Denn der Nachweis potentiell seltener Zellen auf Gefrierschnitten wird dadurch erschwert, dass falsch positive Zellen oder Zellen aus anderen Populationen, die das Antigen ebenfalls exprimieren, das Ergebnis verfälschen können. Solche Zellen müssten mit immunhistologischen Methoden ausgeschlossen werden, was die Gefahr von Kreuzreaktionen erhöht. Für die Zytospins wurden die Thymuszell-Populationen anhand der Bindung für sie charakteristischer Antikörper bzw. eines Lektins charakterisiert. Um die verschiedenen Populationen zu isolieren, wurden mehrere Ansätze verfolgt.

3.1.1 Isolierung von mTEZ und kTEZ mittels Fluoreszenz-Sortierung

TEZ wurden wie beschrieben in Einzelzellsuspension überführt und angereichert. Die angereicherte Suspension wurde wie folgt gefärbt:

α -CD45-PE	Ausschluss der CD45 ^{hi} -Population, Leukozyten
G8.8-FITC	färbt kortikale und medulläre Epithelzellen
CDR1-Red ⁶⁷⁰	färbt kortikale Epithelzellen

Die Thymozyten-Population wurde ausserdem weitgehend durch Ausschluss der kleinen Zellen im „Forward-Scatter“ und im „Side-Scatter“ eliminiert.

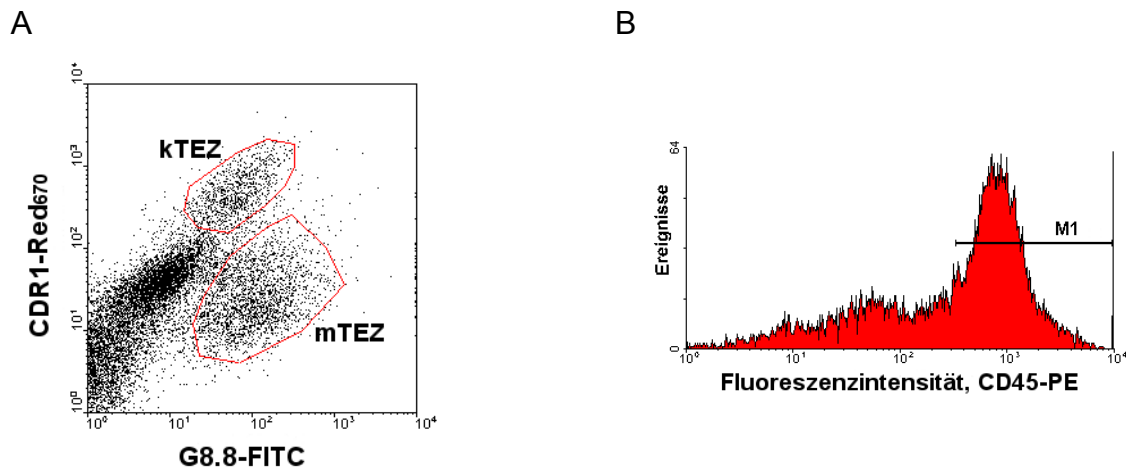


Abb. 3.1: Isolierung von mTEZ und kTEZ. Anhand der oben erwähnten Marker können mTEZ und kTEZ isoliert werden (A). Thymozyten werden anhand ihrer Größe ausgeschlossen, weitere Leukozyten anhand des Leukozytenmarkers CD45 (B). Die mit der Marke M1 bezeichnete Region, die aus CD45^{hi}-Leukozyten besteht, wurde während des Sorts ausgeschlossen.

Die Populationen (Abb. 3.1) wurden mit einem FACS-Vantage-Sorter in vorgelegten FACS-Puffer sortiert und während des „Sorts“ kühl gehalten. Anschließend wurden sie gezählt und mittels Zytospin auf einen Objektträger aufgebracht. Die Reinheit der mTEZ- und kTEZ-Populationen lag bei 99%. Typischerweise wurden mit 20 Thymi Ausbeuten von etwa 300.000 bis 500.000 mTEZ und 200.000 kTEZ erzielt.

Diese Methode eignet sich, um TEZ mit definierten Eigenschaften hoher Reinheit zu isolieren. Nachteile der Methode sind der hohe Zeitaufwand und die starke Belastung, wodurch die Zellen geschädigt werden können.

3.1.2 Isolierung von tDC und Makrophagen im FACS

Die Rosetten-Fraktion wurde wie beschrieben isoliert und angereichert. Die tDC wurden dann mit einem FITC-konjugierten N418-Antikörper (erkennt den DC-Marker CD11c) gefärbt und mittels FACS sortiert. Die Makrophagen wurden anhand ihrer Autofluoreszenz detektiert (Abb. 3.2) und in vorgelegten FACS-Puffer sortiert. Anschließend wurden sie gezählt und auf Objektträger aufgebracht. Die Reinheit der Population lag auch hier bei 99%. Die Ausbeute aus 20 Thymi betrug im Schnitt 500.000 tDC und Makrophagen.

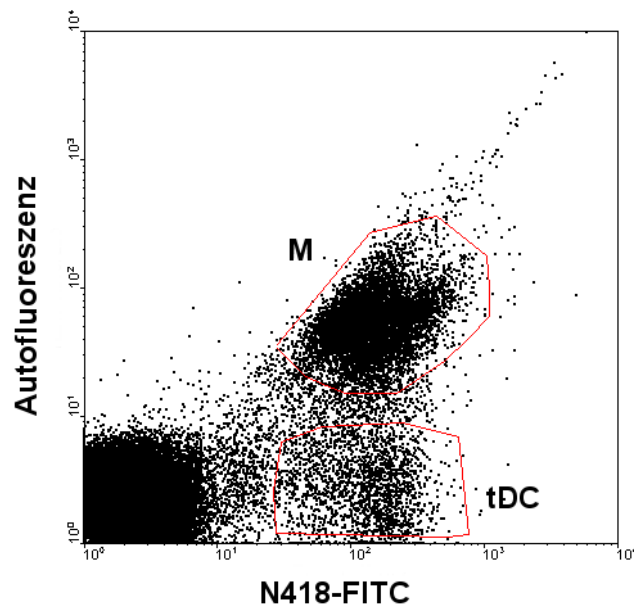
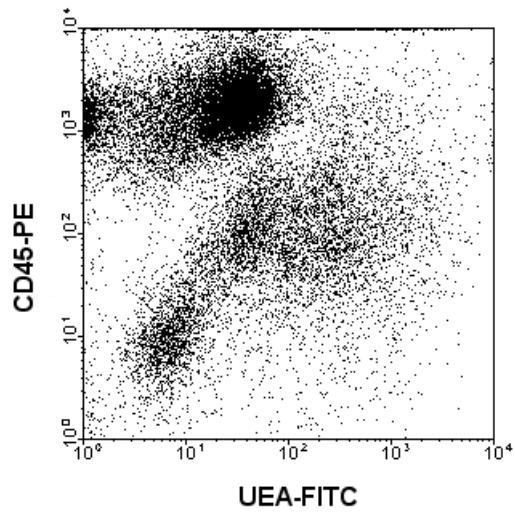


Abb. 3.2: Isolierung von Makrophagen und tDC. Makrophagen wurden anhand ihrer Autofluoreszenz isoliert, tDC anhand der Bindung des FITC-markierten Antikörpers N418.

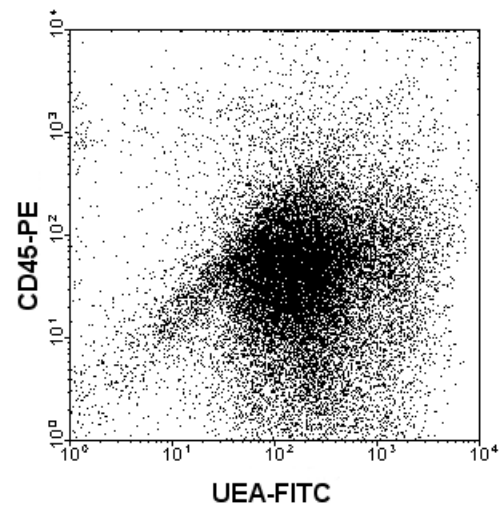
3.1.3 Isolierung von UEA⁺-mTEZ mittels MACS

Da die Isolierung von mTEZ per FACS langwierig ist und die Zellen schädigen kann, wurde eine alternative Methode etabliert. TEZ-Suspensionen wurden mit dem FITC-konjugierten Lektin UEA-1 inkubiert, das an N-Fucosyl-Reste eines großen Teils der mTEZ binden sollte [63]. Die so markierten Zellen wurden dann mit magnetischen Beads inkubiert, die über einen α -FITC-Antikörper an die FITC-markierten Zellen binden, und zweimal über eine MACS-Säule gegeben. Dadurch konnte ein Reinheitsgrad von mindestens 95% bis hin zu 98% erreicht werden (Abb. 3.3). Die Zellen wurden schließlich eluiert, gezählt, per FACS analysiert und dann auf Objektträger zentrifugiert. Die Ausbeute aus 20 Thymi betrug 400.000 bis 700.000 UEA⁺-mTEZ.

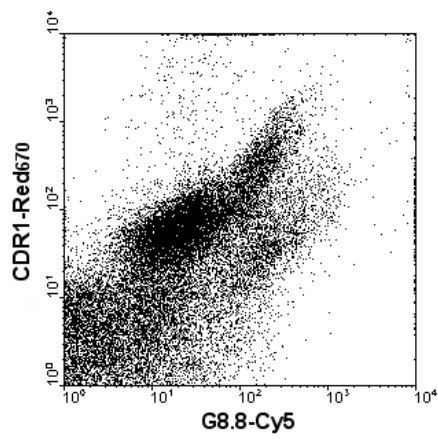
A



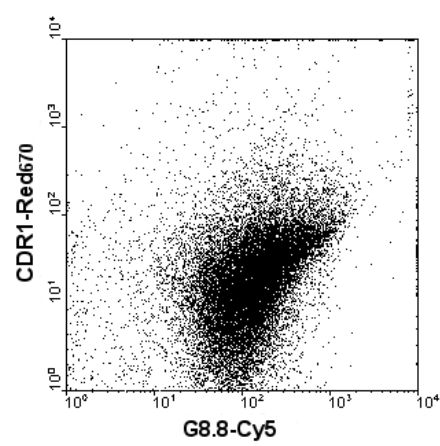
B



C



D



E

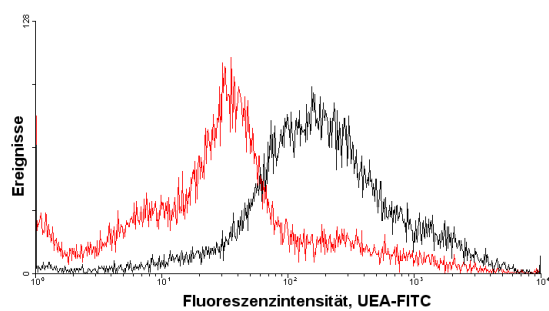


Abb. 3.3: Isolierung der UEA⁺-mTEZ per MACS. *A.* Vor der MACS-Säule beinhaltet die Präparation viele CD45^{hi}-Leukozyten. Die CD45^{lo}-UEA⁺-mTEZ-Population ist deutlich weniger dicht. *B.* Nach Passage durch zwei MACS-Säulen ist die CD45^{hi}-Population eliminiert. Die UEA⁺-Fraktion ist angereichert. *C.* Vor der MACS-Anreicherung beinhaltet die Suspension zahlreiche kTEZ. *D.* Nach der Anreicherung sind auch die kTEZ eliminiert, mTEZ sind angereichert. *E.* Zellen, an die UEA nicht gebunden hat (in der ersten Dekade), sind nach der MACS-Passage aus der Präparation entfernt (rot: vor der MACS-Passage, schwarz: nach MACS-Passage). Die Anreicherung beträgt in diesem Fall 98%.

Die Isolierung UEA⁺-mTEZ per MACS ist eine sinnvolle Alternative zum FACS. Die gewonnene Zellsuspension ist nahezu ebenso rein, und die Aufarbeitung geht wesentlich schneller, wodurch die Zellen geschont werden.

3.2 Detektion von ektopisch exprimierter mRNA auf Einzelzellebene

In diesem Teil der Arbeit soll das Expressionsmuster bestimmter Antigene auf mRNA-Ebene an Zytospins von mTEZ untersucht werden. Der Nachweis von mRNA liefert, wegen der Kurzlebigkeit der mRNA, einen Einblick in die aktuelle Genaktivität zum Zeitpunkt der Fixierung der Zellen. Der Vorteil der Analyse von Zytospins gegenüber der Detektion auf Thymusschnitten ist, dass eine annähernd reine Population von mTEZ in definierter Zahl auf Objektträger aufgebracht und untersucht werden konnte. So könnten Aussagen über die Häufigkeit von ektopisch exprimierenden Zellen gemacht werden, die bei der Analyse von Schnitten schwer möglich sind. Verfälschungen durch Makrophagen und tDC, die zum Teil ebenfalls die untersuchten Antigene auf mRNA-Ebene exprimieren, werden durch die Analyse von definierten Populationen auf Zytospins eliminiert.

Für mehrere Antigene wurden Sonden hergestellt, mit denen die mRNA mittels des *in situ*-Hybridisierungs-Verfahren (ISH) detektiert wurde. Diese Sonden wurden digoxigeniert und dann nichtradioaktiv mit einem AP-konjugierten α -Dig-Antikörper nachgewiesen.

Um zu bestimmen, ob die gewonnenen Sonden spezifisch die gewünschte mRNA detektieren können, wurden Hybridisierungen auf Geweben oder Zelllinien durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie das gesuchte Gen exprimieren. Wenn möglich, wurde den Zelllinien der Vorzug gegeben, weil sie ähnlichen Versuchsbedingungen unterworfen werden können, wie sie bei der Präparation der Epithelzellen vorlagen (Trypsinbehandlung, Zentrifugation, Zytospin). Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der *in situ*-Hybridisierung ist zudem die Zugänglichkeit des Zytoplasmas für die Sonde. Im Gegensatz zum Gefrierschnitt, bei dem das Innere der Zelle angeschnitten ist, muss beim Zytospin durch Fixation das Innere der Zelle nachträglich zugänglich

gemacht werden. Dies konnte nur an Zytospins getestet werden.

Sonden für PLP, S100 β , hCRP und Insulin wurden hergestellt und getestet.

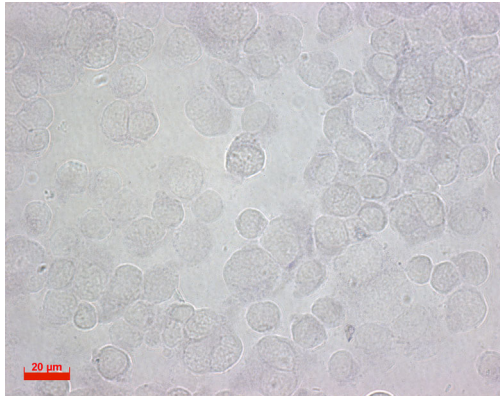
3.2.1 Detektion von PLP

Das Proteolipid Protein (PLP) ist der Hauptbestandteil des Myelins. PLP ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und hat noch eine kürzere alternative Spleißform, die DM20-Variante, die im Thymus vorzugsweise exprimiert wird [67]. Die längere Form des PLP ist 276 AS lang, die DM20-Form ist 35 AS kürzer [96]. Beide Formen sind stark hydrophob. Es ist ein integrales Membranprotein. Welche Funktion PLP und DM20 im ZNS ausüben, ist bislang unklar, vermutet wird eine Rolle bei der Interaktion von Oligodendrozyten und Axonen [97].

PLP wurde als Zielantigen gewählt, weil von ihm bereits bekannt ist, dass es im Thymus transkribiert wird, und weil gezeigt werden konnte, dass die Expression von PLP in mTEZ ohne Beteiligung von tDC Toleranz induzieren kann. Es ist außerdem ein Autoantigen bei der Experimentellen Autoimmun-Enzephalitis (EAE), einem Tiermodell für Multiple Sklerose (MS). Daher ist von Interesse, mit welcher Häufigkeit und mit welchem Expressionsmuster es in mTEZ vorliegt.

Um PLP-mRNA zu detektieren, wurden Oligo-DNA-Sonden erstellt und mit Digoxigenin markiert. Die Spezifität der Sonden wurde auf Oli-neu-Zellen getestet. Diese Oligodendrozyten-Vorläufer-Linie ist dafür bekannt, PLP zu exprimieren [98]. Etwa 50.000 Zellen wurden tryptiniert, gewaschen und auf einen Objektträger aufgebracht, getrocknet und schließlich mit eiskaltem Azeton für 10 min fixiert, um die Zellmembran durchlässig zu machen. Die ISH wurde anschließend bei einer Hybridisierungstemperatur von 58°C durchgeführt. Als Kontrolle dienten Oligonukleotide, die zu den Antisense-Sonden genau komplementär waren. Da sie dieselbe Sequenz aufweisen wie die zu detektierende mRNA, können sie nicht binden und dürfen deshalb kein Signal produzieren.

A



B

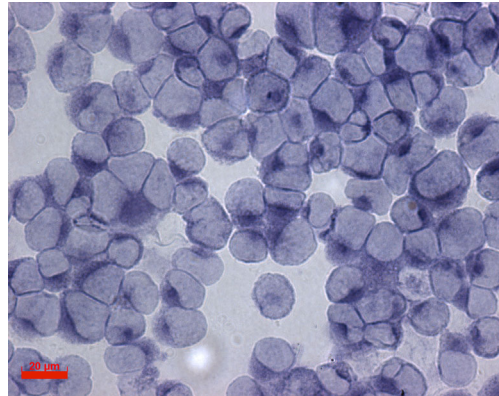
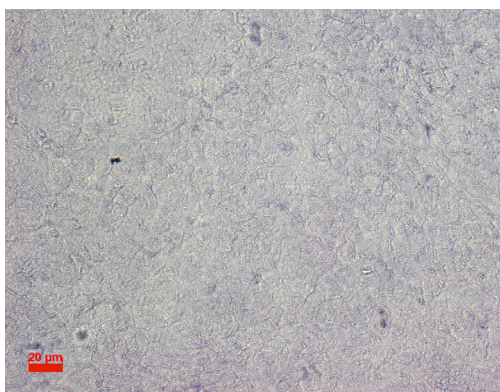


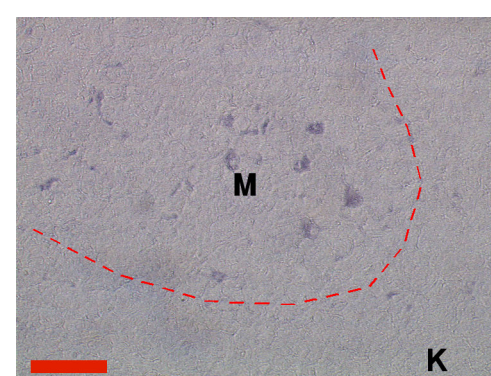
Abb. 3.4: PLP ist mittels ISH auf Zytospins der Oligodendrozytenvorläuferlinie Oli-neu nachweisbar.
A. Die Sense-Sonde liefert auf Oli-neu-Zellen kein Signal. *B.* mRNA für PLP ist mit der Antisense-Sonde im Zytoplasma der Zellen detektierbar. Der Balken entspricht jeweils 20 µm.

Da unter denselben Bedingungen der Einsatz der Sense-Sonde keine Farbreaktion zur Folge hatte, mit der Antisense-Sonde aber eine deutliche, zytoplasmatische Farbreaktion erzeugt wurde (Abb. 3.4), ist gezeigt, dass die Antisense-Sonde spezifisch mit mRNA für PLP hybridisiert. Deshalb, und um einen Hinweis auf die Expression von PLP-mRNA in den beiden Kompartimenten des Thymus zu bekommen, wurde diese Sonde auch auf Thymus-Gefrierschnitten getestet. Hier erzeugte sie eine schwache, aber eindeutige Farbreaktion in wenigen Zellen, die in der Kontrolle nicht zu finden ist (Abb. 3.5).

A



B



C

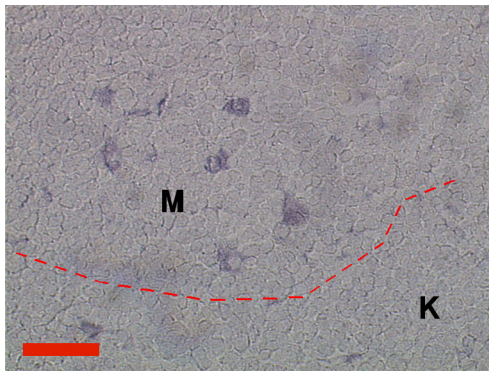


Abb. 3.5: PLP-mRNA ist mittels ISH in Gefrierschnitten von Thymus nachweisbar. *A.* Die Sense-Sonde bindet nicht unspezifisch, sie liefert kein Signal. *B.* Die Antisense-Sonde färbt einzelne Zellen in der Medulla (M) deutlich an. Die positiven Zellen finden sich nicht im Kortex (K). *C.* Ausschnittvergrößerung. Das Signal ist zytoplasmatisch und spart den Kern aus. Der Balken in A entspricht 50 μm , der in B 100 μm und C 40 μm .

Die Farbreaktion ist hauptsächlich medullär (Abb. 3.5). Sie ist, wie für mRNA-Signale zu erwarten, zytoplasmatisch. Die gefärbten Zellen weisen zum Teil die für medulläre Epithelzellen typische Morphologie auf. Es ist jedoch möglich, dass es sich außerdem um Makrophagen oder tDC handelt, da auch in diesen Zellen mittels RT-PCR mRNA für PLP, wenn auch schwächer als in mTEZ, nachgewiesen worden ist [69] und sie in der Medulla häufig sind. Um welche Zellen es sich handelt, sollte durch Wiederholung der ISH auf sortierten G8.8⁺-mTEZ geklärt werden.

Jedoch konnte auf sortierten G8.8⁺-mTEZ keine Färbung etabliert werden, die den Hintergrund übertraf. Die Versuchsbedingungen wurden deshalb abgeändert (längere Inkubation der Sonden mit den Zellen, Variation der Hybridisierungstemperatur in 1°C-Schritten, längere Inkubation mit dem Substrat), aber auch das führte nicht zum Erfolg.

3.2.2 Detektion von S100 β

S100 β ist ein Mitglied einer Proteinfamilie, zu der kleine, saure Ca²⁺-bindende Proteine gehören, die hauptsächlich im ZNS zu finden sind [99, 100]. Sie sind hoch konserviert. Zur Zeit sind 18 verschiedene Proteine dieser Familie charakterisiert. Ihnen wird eine Rolle bei der Bewegung von Zellen, bei der Differenzierung, im Zellzyklus und bei Entzündungsprozessen zugesprochen [101].

S100 β wirkt neurotrophisch und bewirkt das Auswachsen von Neuriten. Es findet sich zytoplasmatisch in allen Gliazellen und in Endothel des ZNS, aber nicht in nachweisbaren Mengen in Neuronen. Es aktiviert die nukleäre Proteinkinase *Ndr*, die die Zellteilung und die Zellmorphologie reguliert. Es ist auch in medullären Epithelzellen der Ratte gefunden worden [102]. S100 β wur-

de ausgewählt, da von ihm bekannt ist, dass es im Thymus exprimiert wird. Außerdem ist es wie PLP ein ZNS-spezifisches Antigen und daher ein Kandidat für Experimente, die klären könnten, ob mehrere für einen Zelltyp spezifische Antigene in derselben mTEZ hergestellt werden. Sonden für S100 β wurden wie beschrieben hergestellt: Ein Teil der cDNA wurde in einen pSK-Vektor inkloniert und mit dem cDNA-Teil als Template mittels „*in vitro* run-off-Transkription“ Digoxigenin-markierte RNA-Sonden hergestellt, die mit etwa 200 nt deutlich größer sind als die Oligonukleotide, die zur Detektion von PLP verwendet wurden. Auch sie wurden auf den bereits beschriebenen Oli-neu-Zellen getestet. Die Antisense-Sonde erwies sich bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C als spezifisch (Abb. 3.6), da die Sense-Sonde kein Signal produzierte. Wie zu erwarten, war auch diese Färbung zytoplasmatisch.

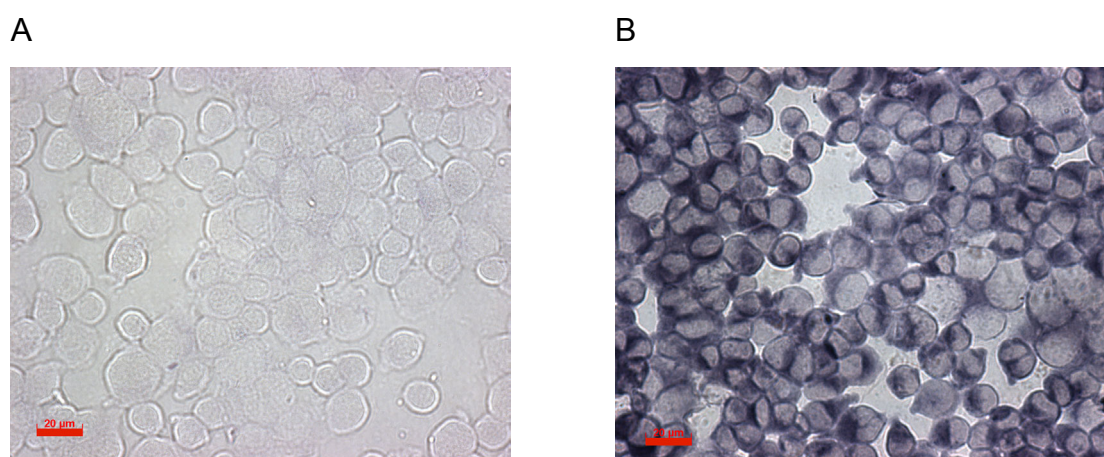


Abb. 3.6: IS100 β -mRNA ist mittels ISH in Zytospins der Oligodendrozytenlinie Oli-neu nachweisbar. A. Die Kontrolle (Sense-Sonde) liefert kein Signal. B. Die Antisense-Sonde detektiert S100 β -mRNA in allen Oli-neu-Zellen. Das Signal findet sich im Zytoplasma der Zellen und ist homogen verteilt. Der Balken entspricht je 20 μ m.

Allerdings konnte sowohl auf Gefrierschnitten von Thymus als auch auf sortierten G8.8⁺-mTEZ keine spezifische Färbung etabliert werden. In beiden Fällen war nur eine schwache Hintergrundreaktion zu erkennen. Auch eine Veränderung der Versuchsbedingungen (siehe 3.2.1, "Detektion von PLP") brachte keinen Erfolg.

3.2.3 Detektion von hCRP

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Akutphaseprotein, das in der Leber als Reaktion auf Trauma oder eine Infektion gebildet wird. Beim Menschen, nicht jedoch in der Maus, ist es das Haupt-Akutphase-Protein, das innerhalb sehr kurzer Zeit Serumwerte annehmen kann, die tau-

sendfach über denen in Ruhe liegen. In der Maus tritt die Serum Amyloid P-Komponente (SAP) an die Stelle von CRP. SAP und CRP sind in Struktur und Funktion homolog. Beide sind Pentraxine, die sich aus fünf scheibenförmig angeordneten, identischen Proteinuntereinheiten zusammensetzen. Sie binden an Zellwandkomponenten von Bakterien und verstärken deren Phagozytose durch Makrophagen.

hCRP wurde in transgenen Mäusen untersucht, da für dieses System bereits gezeigt worden ist, dass die Expression von hCRP im Thymus Toleranz gegenüber hCRP induziert [73]. Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass hCRP-mRNA in seltenen Zellen der Medulla von hCRP-transgenen Tieren zu finden ist [58]. Die verwendete Sonde ist ein Gemisch aus digoxigenierten RNA-Transkripten von 200-500 nt Länge.

Als Spezifitätskontrolle für hCRP wurden Lebern von neugeborenen hCRP-transgenen Mäusen dissoziiert und je 50.000 von ihnen auf Objektträger aufgebracht. Als Kontrolle dienten Zytospins von Leberzellen von nichttransgenen Wurfgeschwistern. Die Sonde ist spezifisch und reagiert gegen hCRP (Abb. 3.7), denn sie färbt keine Zellen auf den Zytospins nichttransgener Lebern an.

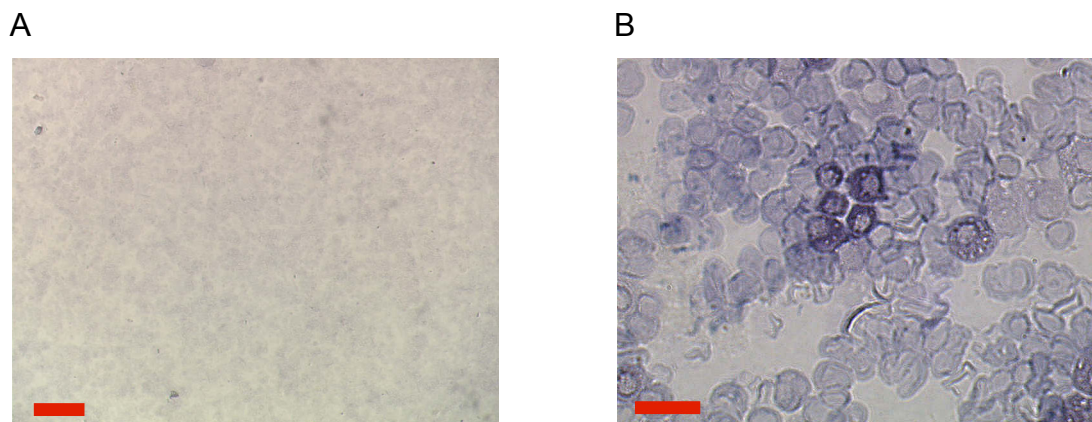


Abb. 3.7: hCRP-mRNA ist mittels ISH in Leberzellen hCRP-transgener Mäuse nachweisbar. A. Die hCRP-Antisense-Sonde liefert auf Wildtyp-Leberzellen neonataler Mäuse kein Signal. B. Leberzellen hCRP-transgener Wurfgeschwister sind hingegen für hCRP-mRNA positiv. Das Expressionsmuster ist heterogen, die positiven Zellen sind granulär. Die Färbung ist zytoplasmatisch. Der Balken entspricht in A 100µm, in B 40 µm.

In Gefrierschnitten von Thymi hCRP-transgener Mäuse wurden bereits hCRP-positive Zellen nachgewiesen [58]. Dennoch konnte auf sortierten G8.8⁺-mTEZ trotz Variation der Versuchsbedingungen keine *in situ*-Hybridisierung etabliert werden, die die Hintergrundreaktion übertraf.

3.2.4 Detektion von Insulin

Insulin ist ein Peptidhormon, das aus zwei Ketten besteht, die 21 bzw. 35 AS lang sind und über Disulfidbrücken verknüpft sind. Es wird in den B-Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas synthetisiert [103]. Insulin wurde als Zielantigen gewählt, da es ein wichtiges Autoantigen für Diabetes Typ 1 ist und für Insulin auf mRNA-Ebene ebenfalls bereits gezeigt worden ist, dass es im Thymus ektopisch exprimiert wird [71].

Diese Sonde wurden von Ruth Ganss, DKFZ, zur Verfügung gestellt. Auf Gefrierschnitten des Pankreas einer C57Bl/6-Maus färbte sie spezifische Bereiche der Langerhansschen Inseln an (Abb. 3.8). Die Sense-Sonde tat das nicht. Damit ist gezeigt, dass diese Sonde spezifisch Insulin-mRNA detektiert.

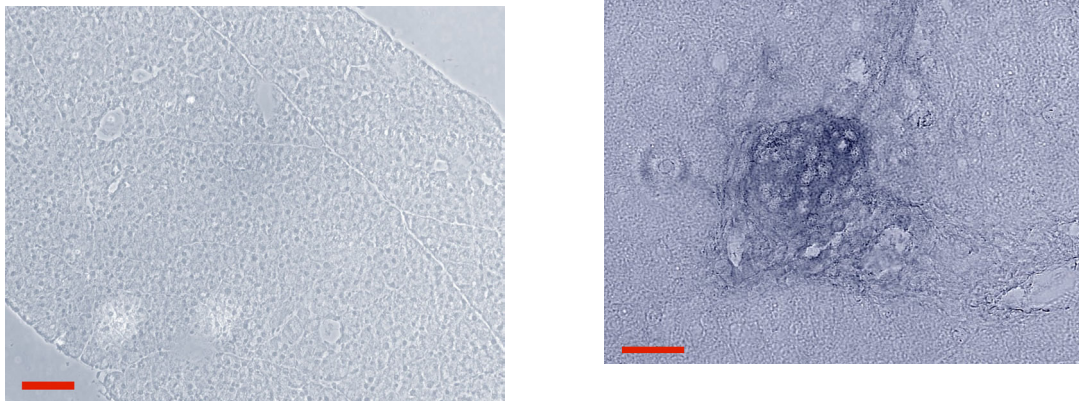


Abb. 3.8: Insulin-mRNA ist mittels ISH in Gefrierschnitten von Pankreas nachweisbar. *A.* Die Kontrollreaktion mit Sense-Sonde liefert kein Signal auf Pankreas-Gefrierschnitten. *B.* Antisense-Sonde für Insulin-mRNA. Eine Langerhanssche Insel ist angefärbt. Der Balken entspricht 500 μm in *A* bzw. 100 μm in *B*.

Obwohl auch diese Sonde auf G8.8⁺-mTEZ kein positives Resultat zeigte, konnten auf Thymus-Gefrierschnitten sehr seltene Zellen angefärbt werden (Abb. 3.9). Diese Zellen befinden sich in der Medulla an der Grenze zum Kortex. Die Kontrolle (Sense-Sonde) ist auch hier negativ.

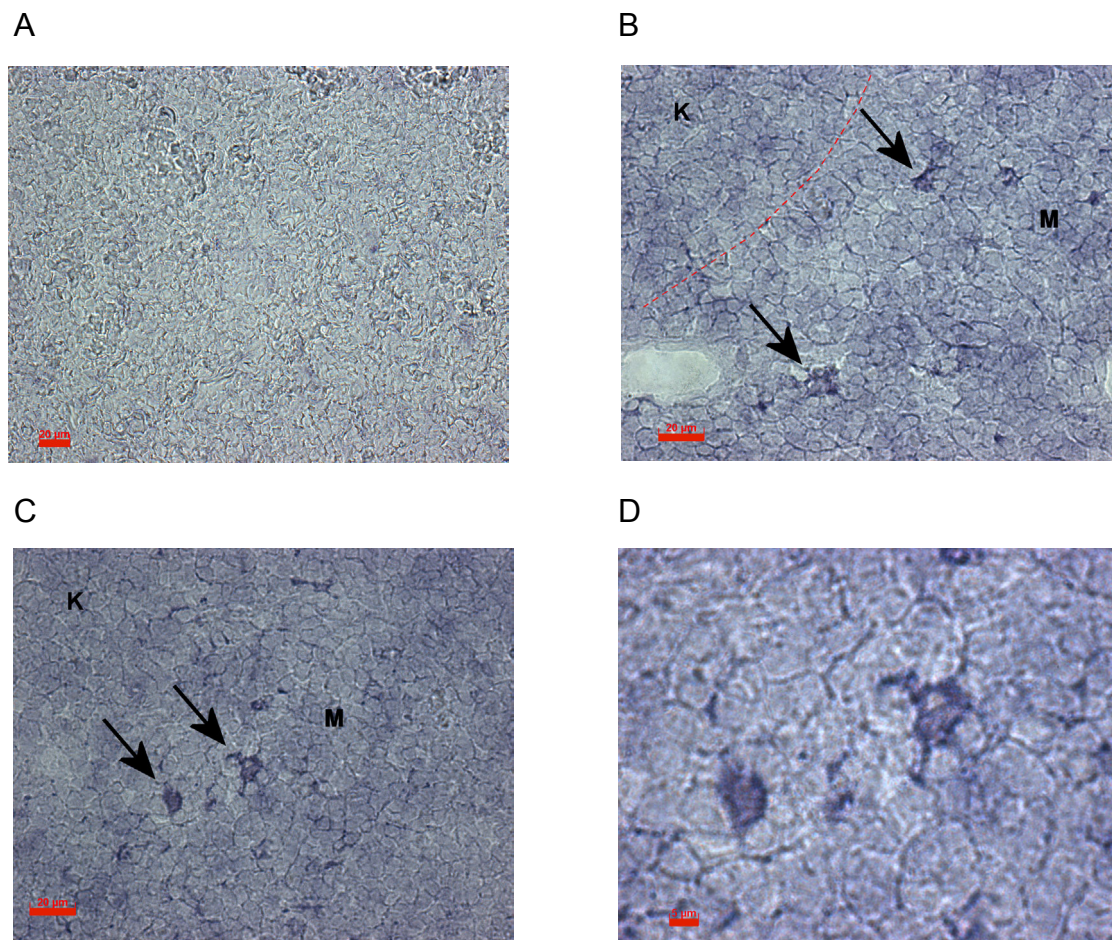


Abb. 3.9: Insulin-mRNA kann mittels ISH auf Thymus-Gefrierschnitten nachgewiesen werden. *A.* Kontrolle, Sense-Sonde auf Thymus-Gefrierschnitt. Es ist kein Signal nachweisbar. *B* und *C*: Am Rand der Medulla (M) sind seltene gefärbte Zellen zu erkennen, im Kortex (K) sind keine gefärbten Zellen zu finden. *D.* Die Vergrößerung zeigt, dass die Zellen einen epithelialen Phänotyp aufweisen. Die Balken entsprechen 50 µm in A, 20 µm in B und C, 5 µm in D.

3.2.5 Zusammenfassung der mRNA-Analyse mittels ISH

Der Nachweis von Insulin- und PLP-mRNA in einzelnen Zellen der Medulla bestätigt bisherige Beobachtungen: Insulin und PLP werden in der Medulla von seltenen Zellen exprimiert. Eine Frequenzabschätzung ist auf Gefrierschnitten jedoch nicht möglich, ebenso wenig wie eine exakte Charakterisierung der exprimierenden Zellen.

Mit keiner der Sonden konnte auf sortierten mTEZ eine Färbung erzielt werden, die über die Hintergrundfärbung hinausging, obwohl die Sonden auf Testgeweben und -zelllinien spezifische Färbungen erzeugten. Auch die Variation der Sonden (kurze Oligo-Sonden, langes RNA-Transkript) brachte keinen Erfolg. Die Färbungen auf vergleichbar fixierten Zytospins zeigten, dass alle Sonden spezifisch mit der gesuchten mRNA reagieren und somit alle prinzipiell geeig-

net sind, mRNA nachzuweisen, sie zeigen auch, dass die Fixierung mit Azeton geeignet ist, um die Zellmembran für die Sonden durchgängig zu machen. Die Signale, die auf Thymus-Gefrierschnitten erzielt werden konnten, zeigten, dass mRNA für zwei Antigene nachgewiesen werden konnte, also im unbehandelten Thymus in detektierbarer Menge in den Zellen vorliegen muss. Es ist möglich, dass die Prozedur zum Aufarbeiten und Sortieren der Zellen diese so stark in Mitleidenschaft zieht, dass mRNA herunterreguliert wird und degradiert, so dass anschließend in einzelnen Zellen keine mRNA nachzuweisen ist.

Weitere Versuche mit bereits vorhandenen Sonden gegen SAP, Haptoglobin, Albumin und anderen Antigenen wurden deshalb nicht durchgeführt.

3.3 Detektion ektopisch exprimierter Proteine auf Einzelzellebene

Da nicht zwingend auch Translation stattfindet, wenn mRNA vorhanden ist, wurde nach den Proteinprodukten der Zielantigene gesucht. Durch den Nachweis des Proteins der Zielantigene kann untersucht werden, ob das intrazelluläre Expressionsmuster der Proteine mit dem übereinstimmt, das von Zellen bekannt ist, die typischerweise das Protein exprimieren.

Auch diese Untersuchungen werden auf Einzelzellebene durchgeführt, um Aussagen über die Häufigkeit ektopisch exprimierender Zellen machen zu können. Zytospins von gereinigten Populationen werden angefertigt und mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz analysiert. Die Anfertigung von Zytospins definierter Zellpopulationen hat nicht nur den Vorteil, dass eine Frequenzabschätzung möglich ist und Signale von Makrophagen, tDC und anderen Zellen des Thymus eliminiert werden, sie minimiert auch die unspezifische Hintergrundreaktion, die oft auf Gewebeschnitten zu finden ist und die die Detektion seltener Antigene verhindern kann. Darüberhinaus können die Expressionsmuster einzelner Populationen (mTEZ, kTEZ, tDC) miteinander verglichen werden.

Es wurden Antikörper gegen verschiedene, ektopisch exprimierte Proteine verwendet. Um möglichst viele Antigene testen zu können, musste auf käufliche Antikörper und Seren mit bekannten Eigenschaften zurückgegriffen werden, von denen sich allerdings auch nur etwa die Hälfte für diese Färbungen eignete, da es sich um Reagenzien handelte, die für das Humansystem entwickelt worden waren. Die übrigen Antikörper und Seren erwiesen sich zwar bis auf wenige Ausnahmen als spezifisch für ihr Antigen, reagierten aber zusätzlich unspezifisch mit Epithelzellen, den im FACS-Sort oder im MACS eingesetzten Zelltyp-spezifischen Antikörpern oder mit Thymusgewebe. Absorption mit Mausserum hatte bei einigen dieser Antikörper

zur Folge, dass die Reaktivität vollends verschwand.

Die Antikörper wurden bzgl. Spezifität und Reaktivität auf Schnitten von Kontrollgewebe getestet und auf allen Geweben titriert. Als Kontrolle diente in jedem Fall die Reaktion des Detektionsantikörpers allein. Weitere Kontrollen werden in den jeweiligen Abschnitten beschrieben. Um auszuschließen, dass die Antikörper unspezifisch an Mauszellen binden, wurden alle Antikörper auf isolierten Leberzellen neonataler Mäuse getestet. Auf diesen Zellen konnte mit keinem Antikörper eine Färbung erzielt werden. Reaktionen gegen ubiquitäre, auf Mauszellen vorkommende Antigene konnten damit ausgeschlossen werden. Diese Kontrollen werden nicht gezeigt.

3.3.1 Detektion von PLP

Der Antikörper gegen PLP (O-10, Maus IgM [90]) wurde mit einem Cy5- bzw. POD-gekoppelten μ -Kette-spezifischen Detektionsantikörper nachgewiesen. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde auf Gehirnschnitten gezeigt, wo sich PLP in der weißen Substanz finden lassen sollte, da es einer der Hauptbestandteile des ZNS-Myelin ist (Siehe "Detektion von PLP" auf Seite 50). Dieser Antikörper reagiert mit dem namensgebenden O-10-Epitop, einer extrazellulären, trypsinsensitiven Domäne des PLP. Er sollte PLP nur in dessen korrekt gefalteter Konformation erkennen [98].

Neben der Zweitantikörperkontrolle wurde für PLP noch eine Kontrolle durchgeführt, die in der kompletten Reaktion bestand, die allerdings auf Gefrierschnitten von Gehirnen von PLP^{-/-}-Mäusen durchgeführt wurde. Auf diesen Schnitten sollte der Antikörper keine Färbung hervorrufen.

3.3.1.1 O-10 färbt spezifisch die weiße Substanz in Gehirnschnitten von PLP^{+/-}-Mäusen

Die Färbung gegen PLP ist spezifisch für die weiße Substanz im Wildtyp-Gehirn. Es werden eindeutig Nervenfasern angefärbt, während die Kontrollfärbung ohne Erstantikörper negativ ist (Abb. 3.10). Zusätzlich zur Sekundärantikörperkontrolle wurde die komplette Färbung auf Gehirn-Gefrierschnitten von PLP^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Auch sie ist negativ.

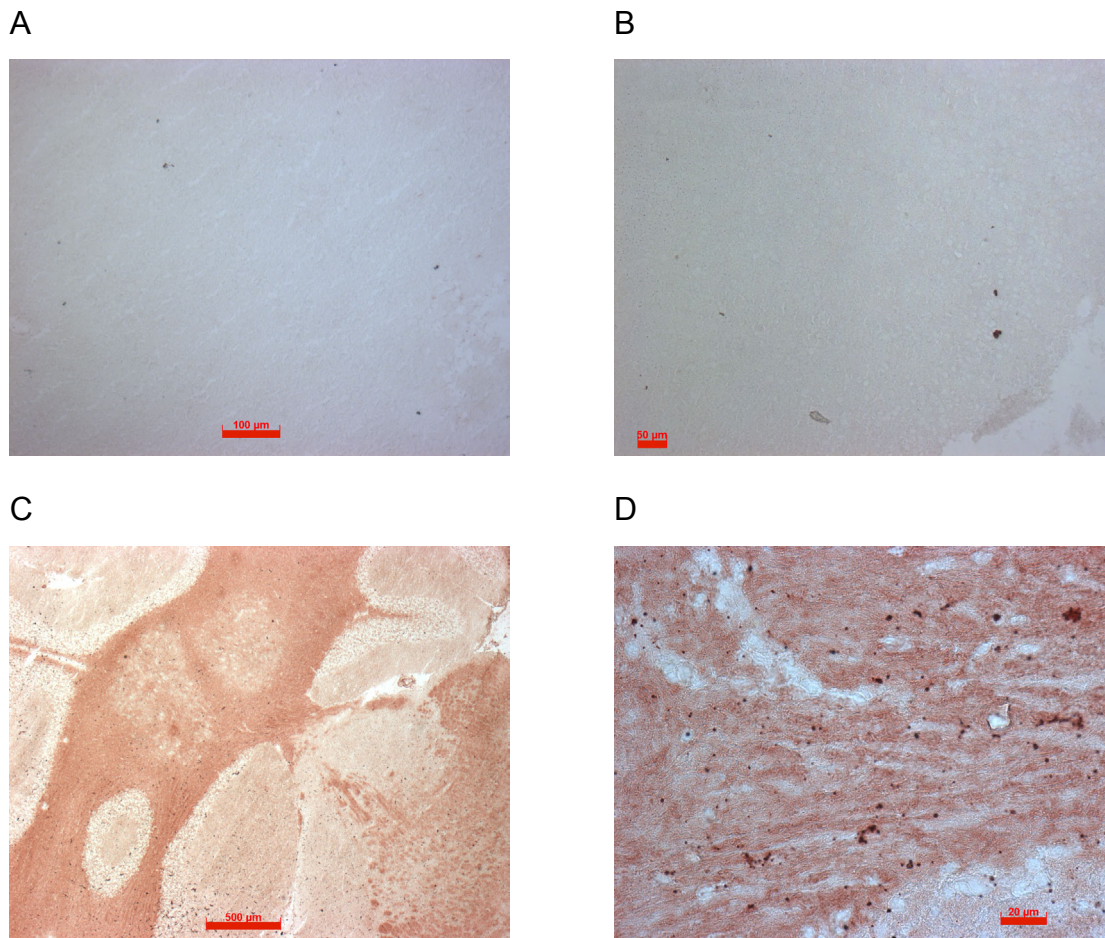


Abb. 3.10: PLP ist in Gefrierschnitten des Gehirns nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von PLP in Gehirn-Gefrierschnitten. *A.* Gefrierschnitt Wildtyp-Gehirn, die Sekundärantikörperkontrolle ist negativ, der Sekundärantikörper reagiert nicht mit dem Gewebe. *B.* Gefrierschnitt $PLP^{-/-}$ -Gehirn, der O-10 reagierte nicht mit $PLP^{-/-}$ -Gehirnen. *C.* In Wildtyp-Gehirnen kann PLP in der weißen Substanz im Myelin nachgewiesen werden. *D.* Die faserige Struktur der vom Myelin ummantelten Nervenfasern der weißen Substanz zeigt sich in der Vergrößerung. Die Balken entsprechen in A, B und C 100, 50 und 500 µm, in D 20 µm.

Mit diesem Antikörper kann also eine spezifische Anfärbung von PLP in Gehirnschnitten erzielt werden.

3.3.1.2 PLP kann in der Medulla und im Kortex des Thymus detektiert werden

Um erste Anhaltspunkte zur Expression von PLP im Thymus zu gewinnen, wurde diese Färbung auch auf Gefrierschnitten des Thymus durchgeführt. Die Sekundärantikörperkontrolle ist negativ (nicht gezeigt), ebenso wie die Färbung auf Thymusschnitten von $PLP^{-/-}$ -Mäusen. Es zeigt sich, dass PLP im Kortex ebenso wie in der Medulla nachgewiesen werden kann (Abb. 3.11), wenn auch im Kortex in weitaus geringerem Maß.

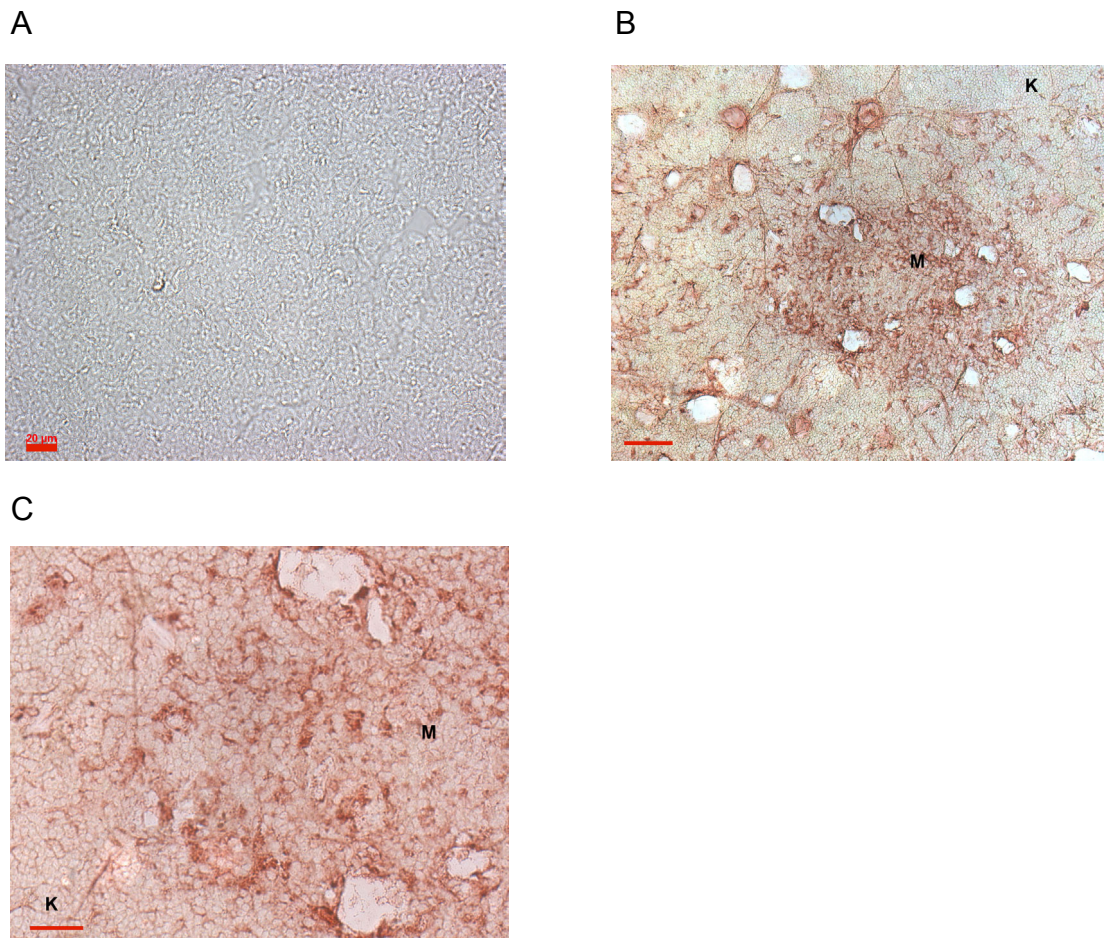


Abb. 3.11: PLP ist in Gefrierschnitten des Thymus nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von PLP. *A.* Auf Gefrierschnitten des PLP^{-/-}-Thymus liefert die Färbung kein Signal. *B.* Auf Gefrierschnitten von Wildtyp-Thymus werden Stromazellen der Medulla stark angefärbt, aber auch im Kortex finden sich positive Zellen. *C.* Vergrößerung der kortiko-medullären Grenze. Die Balken entsprechen 20 μm in A, 100 μm in B, 50 μm in C.

Viele der Zellen zeigen die für Epithelzellen typische Morphologie. Einige der Zellen können jedoch auch Makrophagen oder tDC sein, von denen ebenfalls bekannt ist, dass sie PLP gering exprimieren [69]. Um das zu untersuchen, wurde derselbe Ansatz auf sortierten G8.8⁺-mTEZ durchgeführt.

3.3.1.3 PLP ist in mTEZ und kTEZ detektierbar

Die folgenden Bilder für mTEZ und kTEZ zeigen Präparate, die am selben Tag aus denselben Mäusen gewonnen wurden und die unter denselben Bedingungen in demselben Experiment gefärbt und fotografiert wurden. Deshalb sind die Aufnahmen direkt vergleichbar und liefern einen Anhaltspunkt für die Stärke der Expression von PLP.

Die immunhistologische Färbung mit dem O10-Antikörper zeigt auf G8.8⁺-mTEZ ein heterogenes Färbemuster. Etwa 30% der Zellen sind stark angefärbt. Bei näherer Betrachtung zeigt sich, dass auch die nicht stark gefärbten Zellen braune Granula im Zellinnern aufweisen, die es in der Kontrolle nicht gibt. Die Färbung ist bei allen Zellen im zytoplasmatischen Granula und in der Membran lokalisiert, wie für PLP zu erwarten war, da der verwendete Antikörper nur korrekt gefaltetes, posttranslationell modifiziertes PLP erkennt.

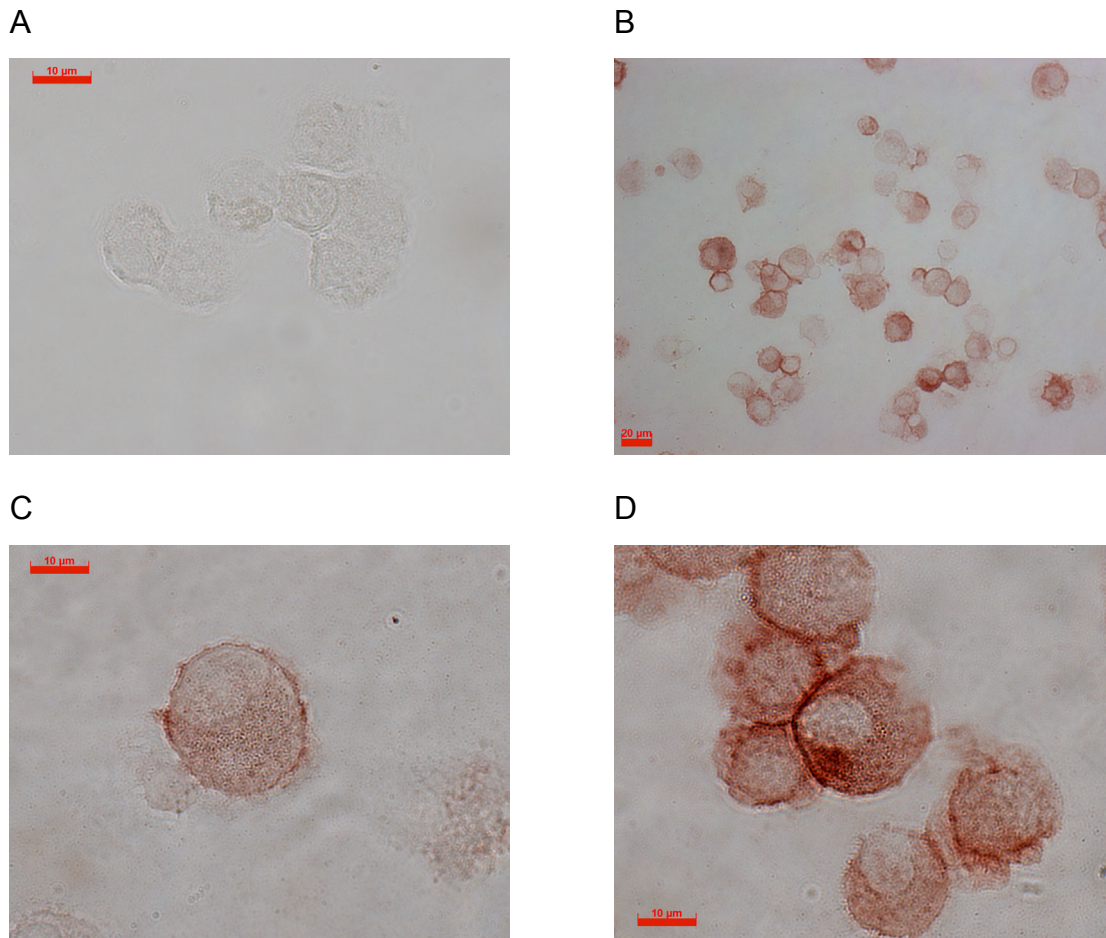


Abb. 3.12: Das PLP-Expressionsmuster von G8.8⁺-mTEZ ist heterogen. Immunhistologischer Nachweis von PLP auf Zytospins sortierter mTEZ. *A.* Die Zweitantikörperkontrolle liefert kein Signal. *B.* PLP kann vor allem in der Zellmembran, aber auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Intensität des Signals ist heterogen, jedoch ist in allen untersuchten Zellen PLP nachzuweisen. *C.* Schwach für PLP gefärbte Zelle. Deutlich ist die Lokalisation der Färbung in der Zellmembran und in kleinen Granula auch im Plasma zu erkennen. Die schwache Färbung ist in der Kontrolle nicht zu finden. *D.* Schwach und stärker gefärbte Zellen. Die Färbung ist in zytoplasmatischen Granula und in der Membran zu finden. Die Balken entsprechen 20 µm (A, B) bzw. 10 µm (C, D).

Auch bei kTEZ ist das Färbemuster sehr heterogen (Abb. 3.13). Etwa 10-20% der Zellen sind stärker angefärbt, jedoch sind diese Zellen weniger stark gefärbt als die entsprechenden Zellen der G8.8⁺-Population und nicht so häufig. Auch hier ist die Färbung in der Membran und im Zytoplasma zu finden. Es zeigt sich, dass hier nicht alle Zellen mit dem O-10 anfärbbar sind (Abb. 3.13). Außerdem fällt die „schwache“ Färbung bei gleichen Bedingungen schwächer aus, als bei den vergleichbaren Zellen der G8.8⁺-Präparation. Auch die schwache Färbung fehlt in den Kontrollen, ist also spezifisch.

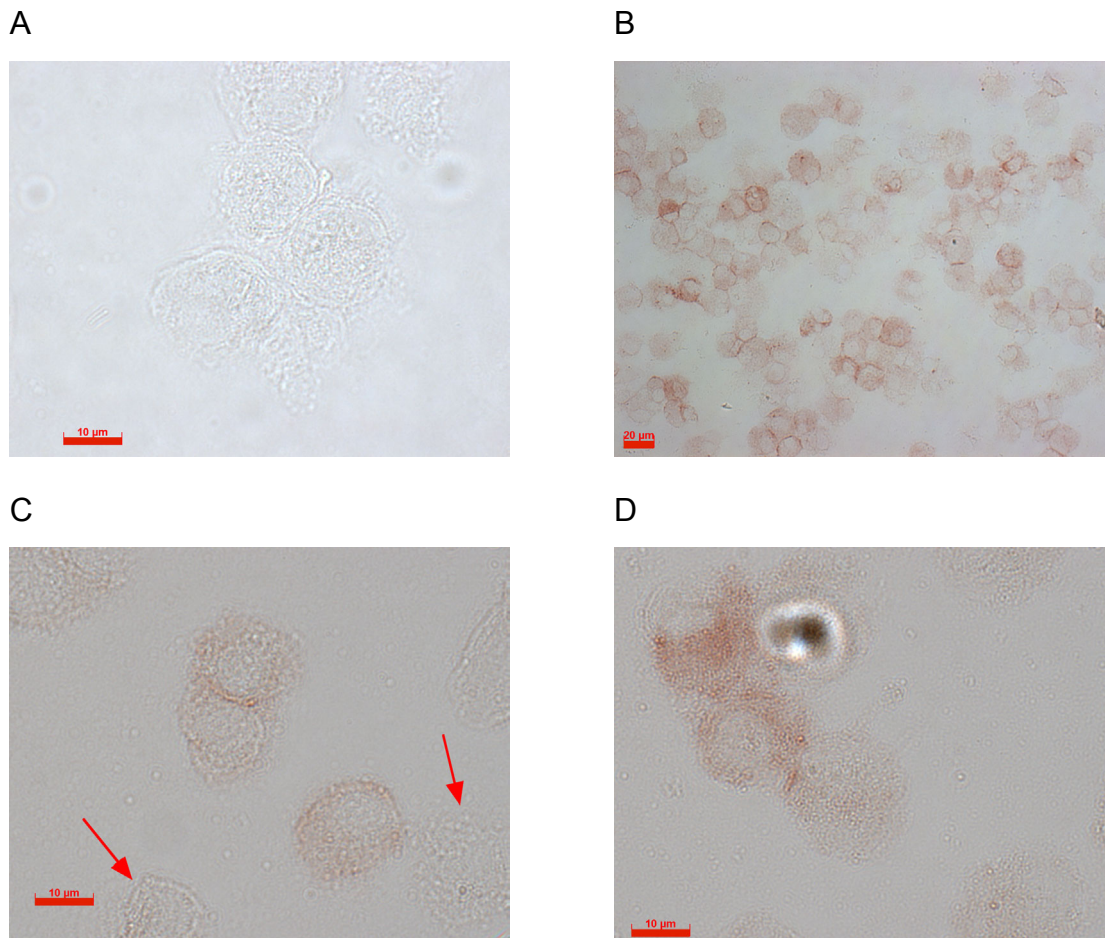
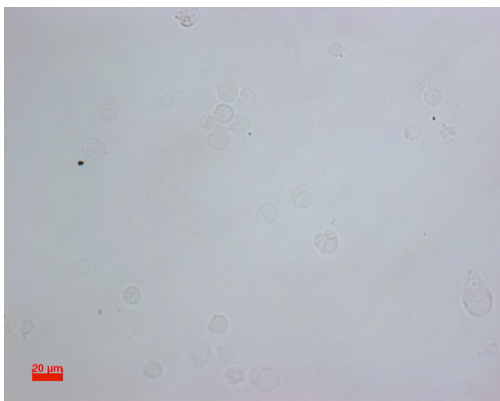


Abb. 3.13: PLP-Expression ist in kTEZ nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von PLP in kTEZ-Zytospins. *A.* Der Zweitantikörper reagiert nicht mit kTEZ. *B.* Das PLP-Expressionsmuster in kTEZ ist heterogen, nicht alle kTEZ sind positiv für PLP. *C.* Die Vergrößerung zeigt, dass auch hier PLP vor allem in der Zellmembran, aber auch in zytoplasmatischen Granula nachgewiesen werden kann. Die Anfärbung fällt schwächer aus als die der G8.8⁺-mTEZ, die in demselben Experiment gefärbt worden sind. In einigen Zellen kann kein PLP nachgewiesen werden (Pfeile). *D.* Die stärker exprimierenden Zellen sind deutlich schwächer gefärbt als die entsprechenden G8.8⁺-mTEZ. Die Balken entsprechen 10 µm in A, C und D und 20 µm in B.

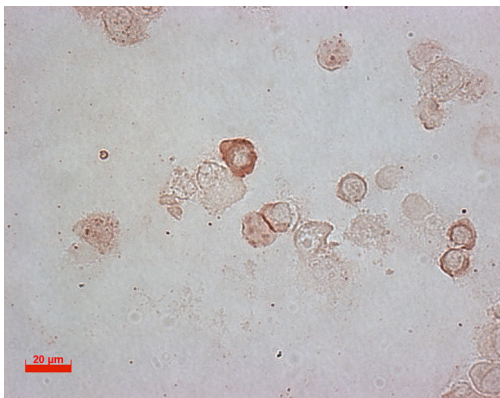
3.3.1.4 Die Expressionsmuster von mTEZ-Subpopulationen unterscheiden sich voneinander

UEA⁺-mTEZ bilden eine Subpopulation der G8.8⁺-mTEZ. Es wird diskutiert, ob sie ein späteres Differenzierungsstadium der mTEZ darstellen und deshalb ein anderes Expressionsmuster für die untersuchten Antigene aufweisen. Auf UEA⁺-mTEZ ist das Bild jedoch dem, das mit G8.8⁺-mTEZ gewonnen wurde, sehr ähnlich. Zusätzlich zum bereits bekannten Muster treten einige stark angefärbte Zellen deutlich hervor (Abb. 3.14). Diese stark angefärbten Zellen sind mit einer Frequenz von 5% vorhanden. Der Hintergrund in der Kontrollfärbung ist negativ, so dass die leichte Braunfärbung eine spezifische Färbung sein muss. Bei stärkerer Vergrößerung wird deutlich, dass diese Färbung in der Zellmembran und außerdem zytoplasmatisch in Granula lokalisiert ist.

A



B



C



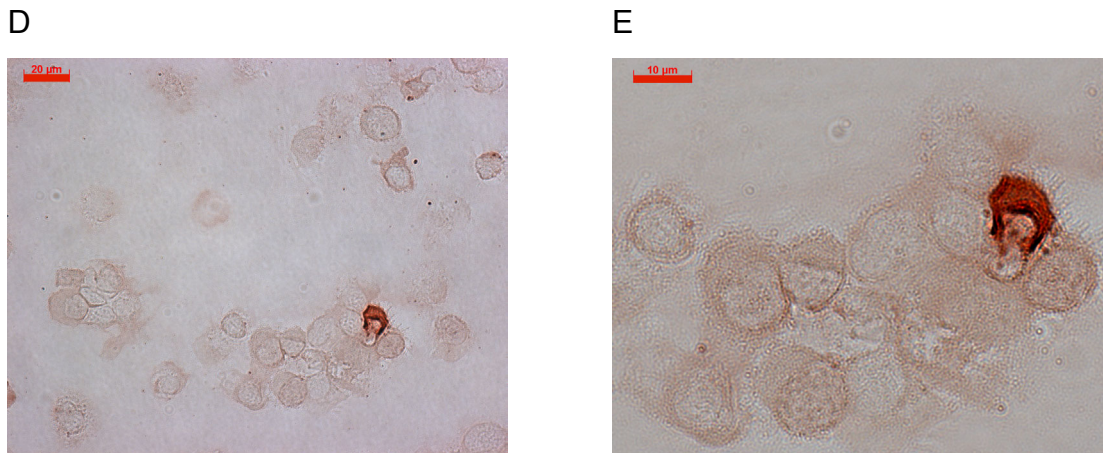
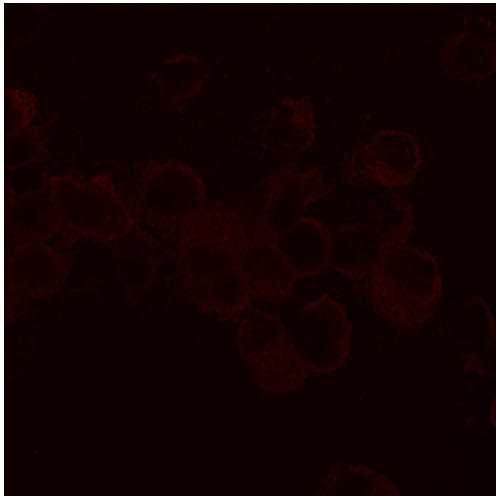


Abb. 3.14: Die PLP-Expression in UEA⁺-mTEZ ist heterogen. Immunhistologischer Nachweis von PLP in mTEZ-Zytospins. *A.* Die Sekundärantikörperkontrolle zeigt kein Signal. *B.* In jeder Zelle konnte PLP nachgewiesen werden. Die Färbung ist in der Zellmembran und im Zytoplasma lokalisiert. Sie ist sehr heterogen. *C.* Zwei stark exprimierende Zellen liegen direkt nebeneinander und sind von schwach exprimierenden Zellen umgeben. Solche Doublettenbildung konnte mittels ISH auch für hCRP-exprimierende Zellen gezeigt werden [58]. *D.* Wenige Zellen exprimieren deutlich stärker als andere. Diese Zellen fehlen in G8.8⁺-mTEZ. *E.* Im Fall stark exprimierender UEA⁺-mTEZ ist das Zytoplasma deutlich stärker angefärbt. Die umliegenden, schwach exprimierenden Zellen sind stärker gefärbt als die Kontrollen. Die Balken entsprechen 20 µm (A, B, D), 5 µm (C) und 10 µm (E).

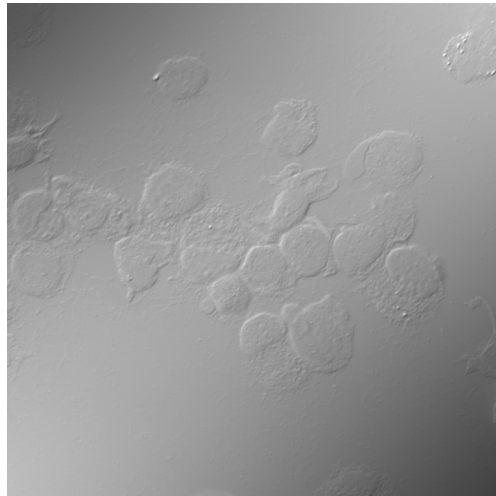
3.3.1.5 Mittels Immunfluoreszenz ist PLP in jeder UEA⁺-mTEZ detektierbar

Zur Unterstützung der Daten, die mittels Immunhistologie gewonnen wurden, wurden UEA⁺-mTEZ mit O10 und einem Cy5-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Die Resultate entsprechen denen der Immunhistologie. Durch die hohe Empfindlichkeit der verwendeten Detektionsmethode (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) können auch sehr schwach exprimierende Zellen visualisiert werden, so dass die Anzahl der schwach gefärbten Zellen bei über 90% liegt, während sich die der stark gefärbten Zellen nicht ändert (5-10%). Jede betrachtete Zelle ist nun für PLP zumindest schwach positiv (Abb. 3.15).

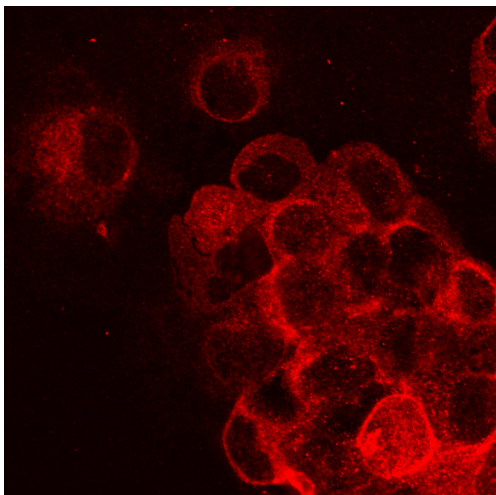
A



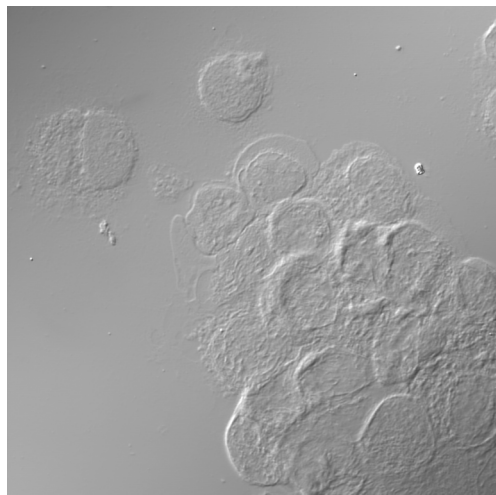
B



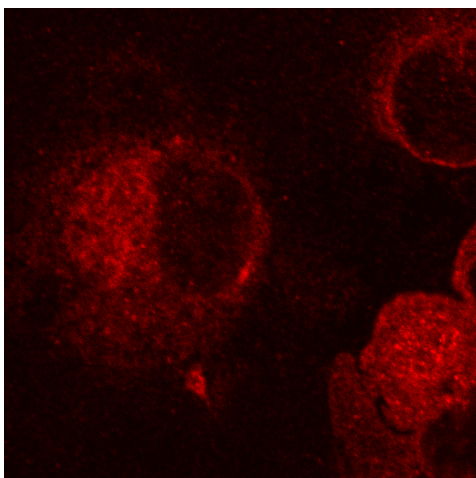
C



D



E



F

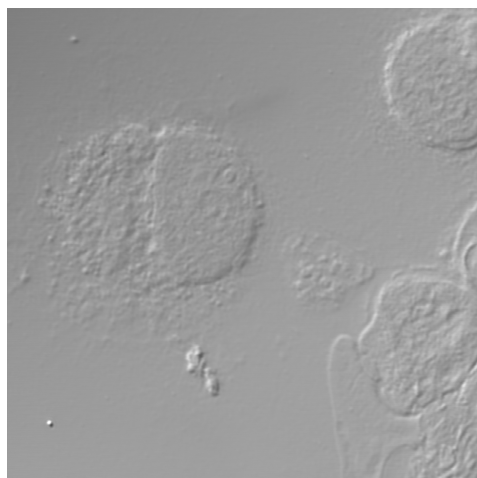


Abb. 3.15: Jede untersuchte UEA⁺-mTEZ ist für PLP positiv. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, Zytospins von UEA⁺-mTEZ wurden mit O10 und einem Cy5-konjugiertem Zweitantikörper gefärbt. *A.* Der Zweitantikörper verursacht nur eine schwache Hintergrundfärbung. *B.* Differential-Interferenzkontrast (DIC)-Darstellung der Kontrolle aus *A.* *C.* PLP lässt sich mit Immunfluoreszenz in jeder Zelle nachweisen. Die Färbung ist heterogen, wenige Zellen sind stark angefärbt. *D.* DIC-Darstellung der Zellen in *C.* *E.* Die Färbung ist auf die Zellmembran und das Zytoplasma beschränkt. *F.* DIC-Darstellung von *E.* Der Ausschnitt repräsentiert in *A, B, C* und *D* 100 µm, in *E* und *F* 35 µm.

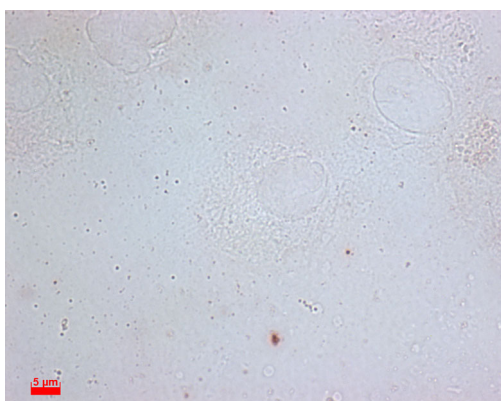
Die Färbung ist auch hier zytoplasmatisch in Granula und in der Membran lokalisiert. Sie übersteigt das Signal der Zweitantikörperkontrolle deutlich, die Hintergrundreaktion ist vernachlässigbar gering.

3.3.1.6 PLP ist in tDC nicht nachweisbar

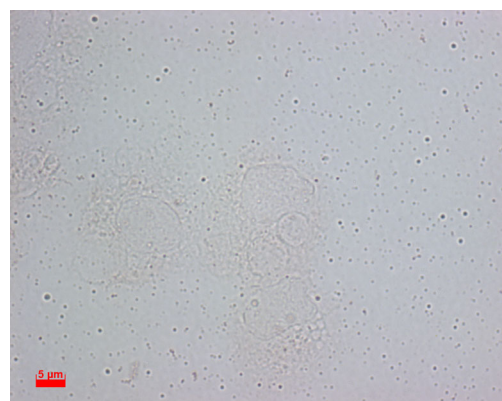
mRNA für PLP konnte mittels RT-PCR in tDC nachgewiesen werden, wenn auch schwächer als in mTEZ [69]. PLP in tDC stellt offenbar einen Teil des hämatopoetischen Selbst dar und ist an der negativen Selektion gegen PLP beteiligt [67]. Dazu muss es jedoch in tDC auch als Protein exprimiert werden. Um das herauszufinden, wurden per N418 isolierte tDC auf Objektträger aufgebracht und mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz gegen PLP analysiert.

Es konnte weder mit Immunhistologie noch mit Immunfluoreszenz ein Signal für PLP in tDC gefunden werden. PLP ist demnach mit unserer Methode in tDC nicht nachweisbar (Abb. 3.16).

A



B



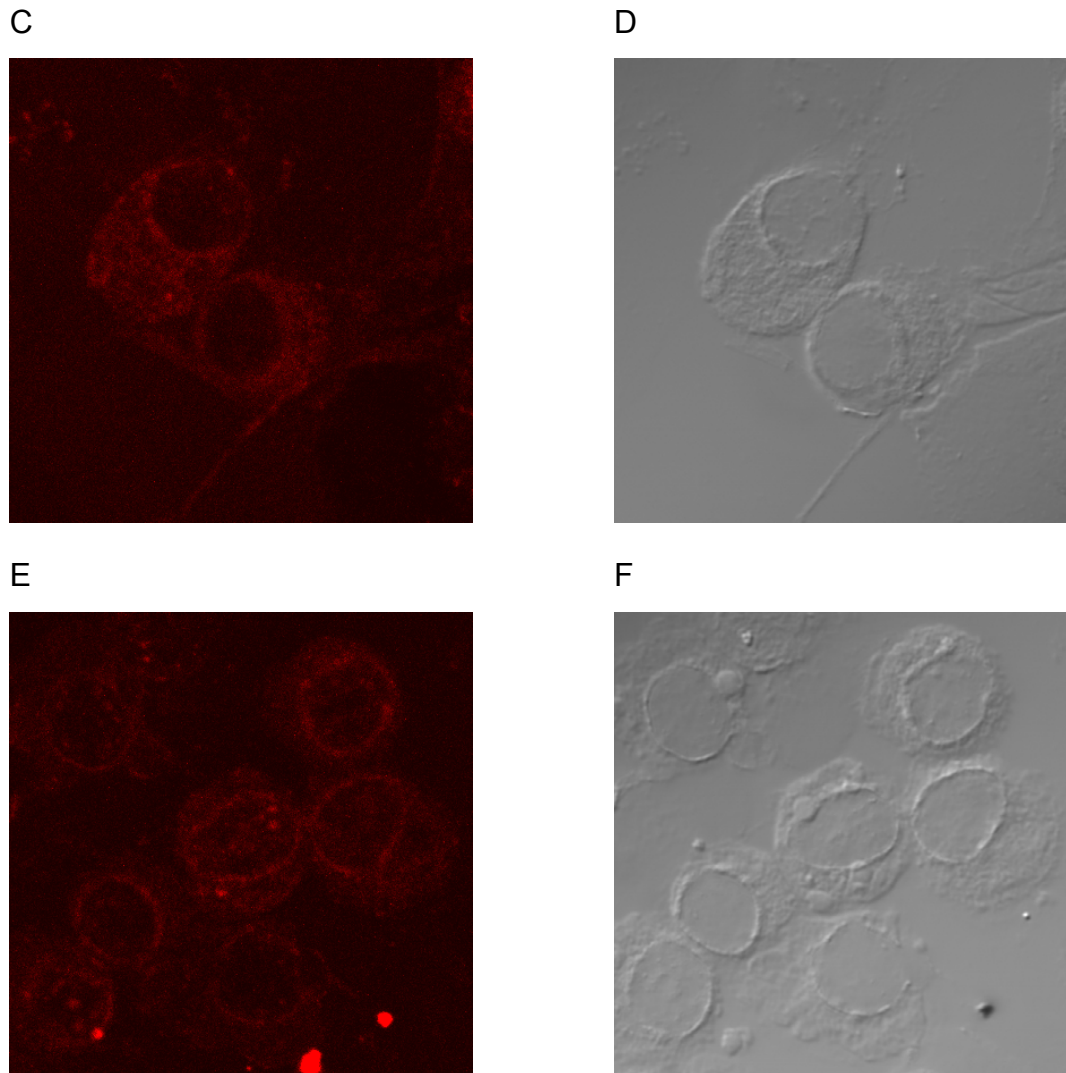


Abb. 3.16: PLP ist in tDC nicht nachweisbar. *A.* Immunhistologische Färbung gegen PLP mit Zytospins aus N418⁺-tDC. Die Zweitantikörperkontrolle liefert kein Signal. *B.* Auch die Färbung mit O-10 liefert kein Signal. *C.* Immunfluoreszenz gegen PLP. Die Kontrolle zeigt ein leichtes Hintergrundsignal. *D.* DIC-Darstellung von *C.* *E.* Nach der kompletten Färbung ist auf tDC kein Signal nachweisbar, das die Hintergrundfärbung übertrifft. *F.* DIC-Darstellung von *E.* Die Balken entsprechen in *A* und *B* 5 μm , die Ausschnitte in *C*, *D*, *E* und *F* 50 μm .

Die Expression von PLP als Protein ist eine Eigenschaft der mTEZ und zu einem geringeren Anteil auch der kTEZ. In tDC ist PLP nicht als Protein nachzuweisen. Die Expression in mTEZ und kTEZ ist heterogen, aber in allen betrachteten mTEZ gefunden worden. In der kTEZ-Fraktion treten hingegen negative Zellen auf. Die subzelluläre Verteilung von PLP entspricht der in Oligodendrozyten. In der UEA⁺-Fraktion sind stark exprimierende Zellen häufiger und stärker gefärbt, als in der G8.8⁺-Fraktion.

3.3.2 Detektion von S100 β

S100 β , ein intrazelluläres kalziumbindendes Protein, läßt sich im Zytoplasma von Glia- und Endothelzellen des ZNS finden [101] und ist bereits im Thymus von Ratten beschrieben worden [102]. Da es ebenfalls im ZNS exprimiert wird, ist es ein möglicher Kandidat für Ko-Expressionsanalysen mit PLP. Auch hier wurde das Expressionsmuster von S100 β in tDC- und kTEZ-Zellpräparationen untersucht, um zu sehen, ob die ektopische Expression von S100 β spezifisch für mTEZ ist.

Die Spezifität des Antikörpers gegen S100 β (Serum, Kaninchen α -S100 β aus Rind, Dako) wurde auf Gehirn-Gefrierschnitten getestet. Als Kontrolle wurde nicht nur die Zweitantikörperkontrolle durchgeführt, die hier deshalb nicht gezeigt wird, sondern es wurde vorverdünntes Antiserum für eine halbe Stunde mit 30 nM freiem S100 β inkubiert, ehe es auf die Kontrollpräparation gegeben wurde. Durch die Blockade des Antiserums mit freiem Antigen wird die Aktivität des Antiserums blockiert. Farbreaktionen, die auf diesen Präparationen zu sehen sind, sind somit unspezifisch.

3.3.2.1 Nachweis der Spezifität auf Gehirn-Gefrierschnitten

Das Antiserum erwies sich als spezifisch, da es an die bekannten Zielstrukturen im Gehirn bindet und durch Zugabe von freiem Antigen blockierbar ist. Zu sehen sind Endothelzellen und einzelne Gliazellen (Abb. 3.17).

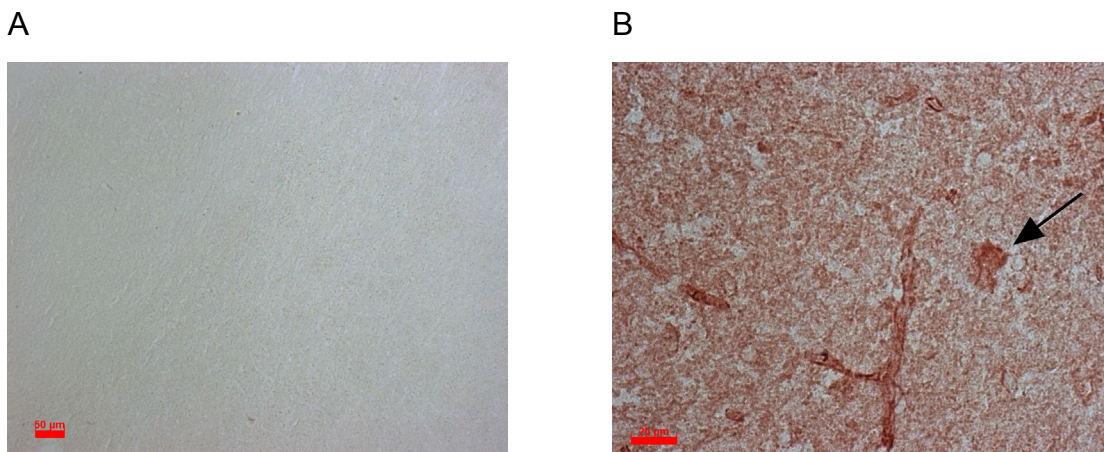
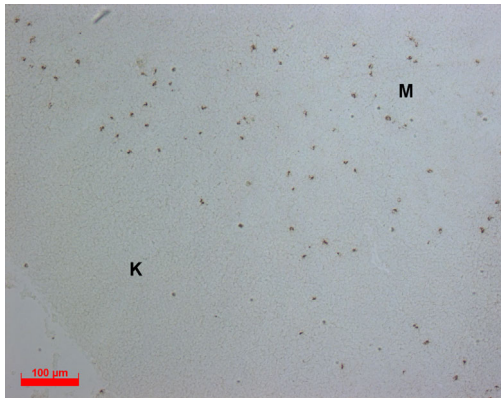


Abb. 3.17: S100 β kann immunhistologisch in Gehirn-Gefrierschnitten nachgewiesen werden. *A.* Blockade des Erstantikörpers mit freiem S100 β führt zum vollständigen Verlust des Signals. *B.* Gefärbt sind Endothelzellen (längliche Struktur) und Gliazellen (Pfeil). Die Balken entsprechen 50 μ m in A und 20 μ m in B.

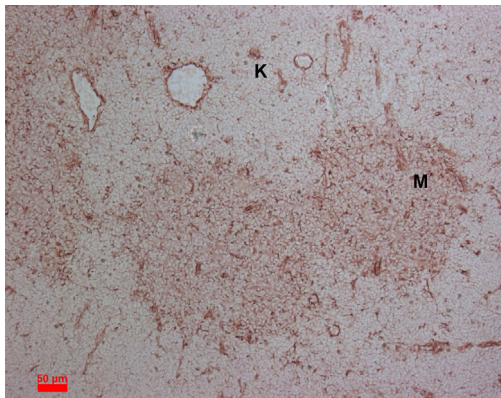
3.3.2.2 S100 β ist in Thymus-Gefrierschnitten detektierbar

Nachdem sich gezeigt hatte, dass das Serum gegen S100 β spezifisch Antigen detektiert, wurde er in gleicher Weise auf Gefrierschnitten von Thymus getestet, um erste Hinweise auf die Verteilung des Proteins im Thymus zu erhalten.

A



B



C

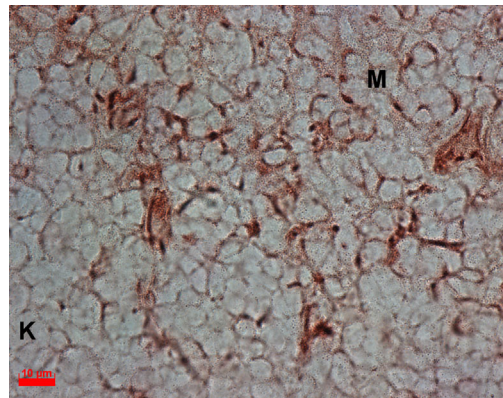


Abb. 3.18: S100 β kann immunhistologisch im Thymus nachgewiesen werden und ist häufig in der Medulla zu finden. Immunhistologischer Nachweis von S100 β in Gehirn-Gefrierschnitten. *A.* Blockade des Erstantikörpers führt zum Verlust des Signals. Die endogene Peroxidase einzelner Makrophagen ließ sich nicht inaktivieren, diese sind aber deutlich seltener als die gefärbten Zellen in B und C. *B.* Die Medulla ist von S100 β -positiven Zellen durchsetzt, aber auch im Kortex finden sich einzelne positive Zellen. *C.* Die positiven Zellen weisen zum Teil die epitheliale Morphologie auf, bei anderen könnte es sich aber auch um tDC oder Makrophagen handeln. Die Balken entsprechen 100 μ m in A, 50 μ m in B und 10 μ m in C.

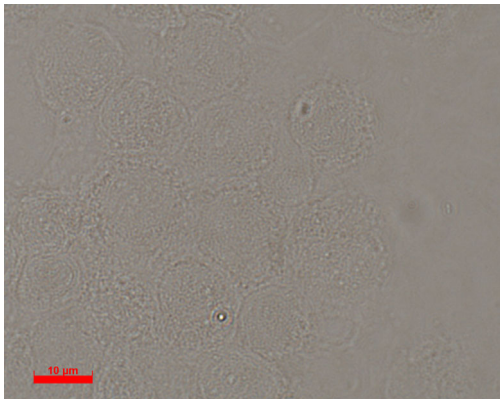
In der Kontrolle finden sich viele Makrophagen, die durch endogene Peroxidase, die sich nicht quenchen ließ, ebenfalls angefärbt wurden. Sie sind jedoch weitaus seltener als die angefärbten Zellen in der Medulla, wie man es für die mit dem α -S100 β -Antiserum gefärbten Zellen beobachten kann (Abb. 3.18). S100 β^+ -Zellen finden sich ähnlich wie PLP $^+$ -Zellen vor allem in der Medulla, zu einem geringen Anteil auch im Kortex. In beiden Kompartimenten könnten auch

Makrophagen und tDC spezifisch gefärbt sein, denn Untersuchungen mittels RT-PCR zeigen, dass Makrophagen und tDC mRNA für S100 β bilden. Ob tDC, kTEZ und beide mTEZ-Populationen S100 β auch als Protein exprimieren, wurde anhand von Zytospins der Populationen untersucht.

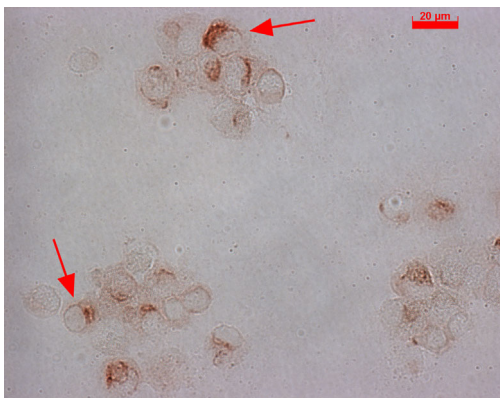
3.3.2.3 S100 β ist in mTEZ und kTEZ nachweisbar

Einige G8.8⁺-mTEZ lassen sich sehr stark und spezifisch mit dem Serum anfärben (Abb. 3.19). Die Kontrolle (Blockade mit freiem Antigen) ist ungefärbt. Auch hier zeigt sich jedoch bei höherer Vergrößerung, dass alle betrachteten Zellen S100 β exprimieren, wenn auch in sehr geringem Maß. Die Färbung ist zytoplasmatisch.

A



B



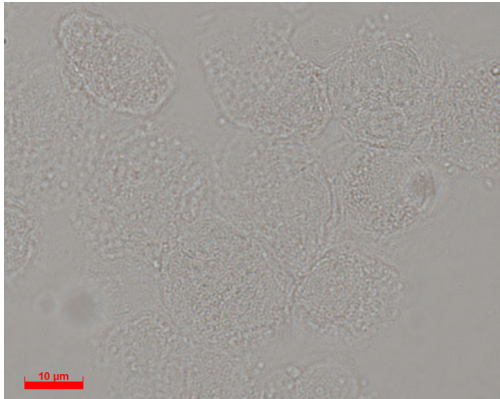
C



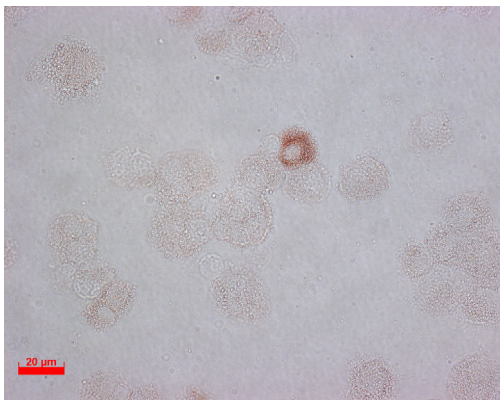
Abb. 3.19: S100 β ist in allen betrachteten G8.8⁺-mTEZ nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von S100 β in G8.8⁺-mTEZ-Zytospins. *A.* Blockade des Erstantikörpers mit freiem S100 β eliminiert das Signal vollständig. *B.* Die Verteilung von S100 β ist heterogen. Einige mTEZ sind stärker angefärbt (Pfeil). *C.* Jedoch kann in allen betrachteten mTEZ S100 β zumindest in geringem Maß nachgewiesen werden. Die Färbung ist zytoplasmatisch und übertrifft auch bei schwach angefärbten mTEZ (Pfeil) die Kontrollreaktion deutlich. Die Balken entsprechen 10 μ m in A, 20 μ m in B und 10 μ m in C.

Kortikale Zellen sind nur zu einem kleinen Prozentsatz stark angefärbt (5%). Die Färbung der übrigen Zellen ist deutlich schwächer, liegt aber über der der Kontrolle (Abb. 3.20).

A



B



C

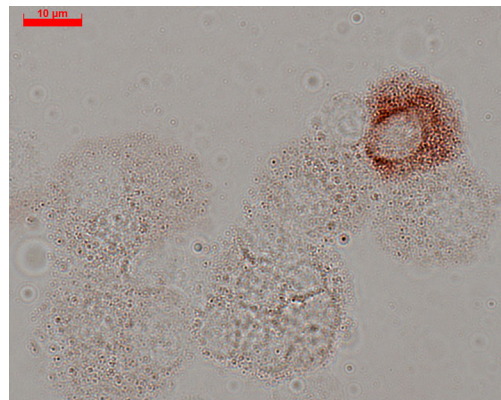


Abb. 3.20: S100β ist in kTEZ nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von S100β in CDR1⁺-kTEZ-Zytospins. *A.* Blockade des Erstantikörpers mit freiem S100β eliminiert das Signal vollständig. *B.* Sehr wenige kTEZ sind stark angefärbt. Die Färbung liegt auch hier im Zytoplasma vor. *C.* Die Vergrößerung zeigt, dass im Zytoplasma der betrachteten kTEZ ein geringes Signal für S100β vorhanden ist. Es ist etwas stärker als die Hintergrundreaktion. Die Balken entsprechen 10 μm in A und C und 20 μm in B.

3.3.2.4 Die Expressionsmuster von G8.8⁺- und UEA⁺-mTEZ unterscheiden sich voneinander

Auch in der UEA⁺-Fraktion finden sich spezifisch anfärbbare, stark gefärbte Zellen, die die für S100β charakteristische, c-förmige zytoplasmatische Anfärbung zeigen (Abb. 3.21). Sie sind zahlreicher als in der G8.8⁺-Fraktion. Auch im Zytoplasma der schwach exprimierenden Zellen zeigen sich braune Granula. Die Kontrolle (Blockade mit freiem Antigen) ist negativ.

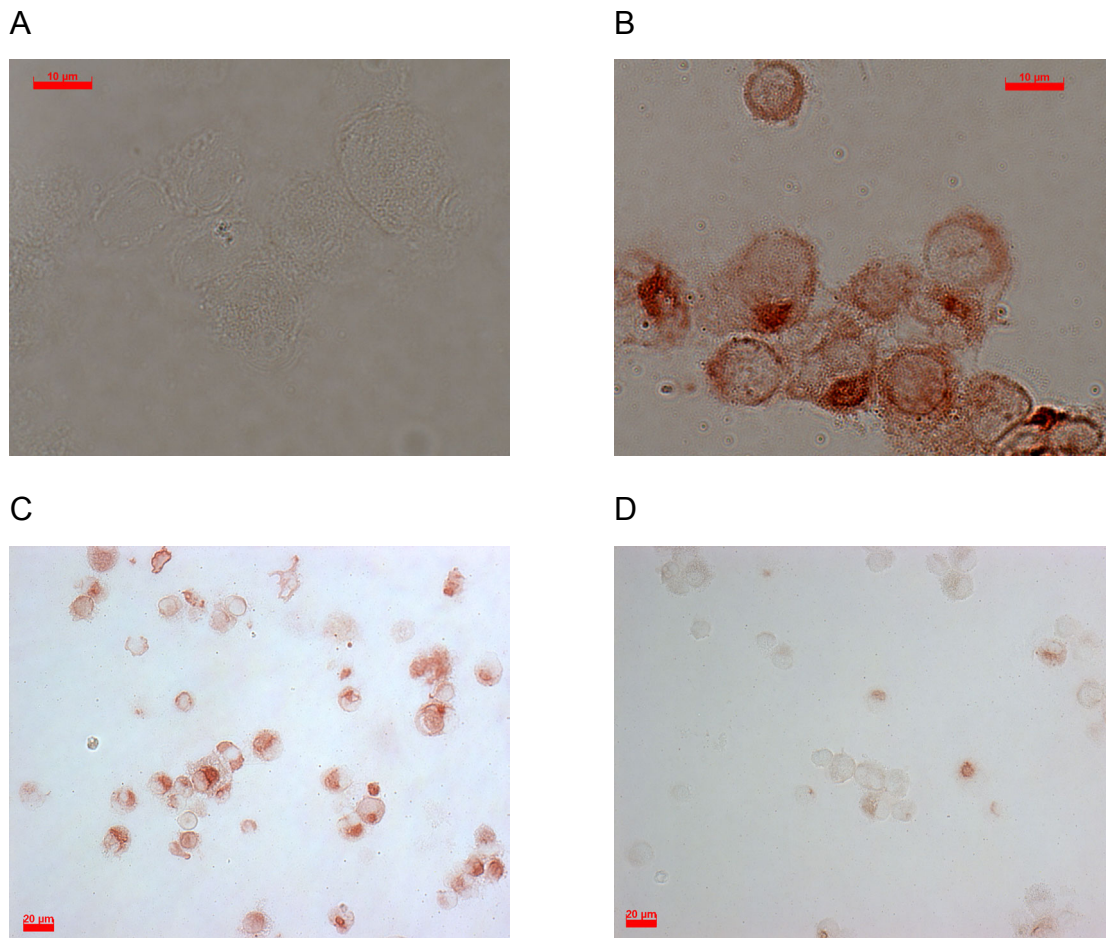


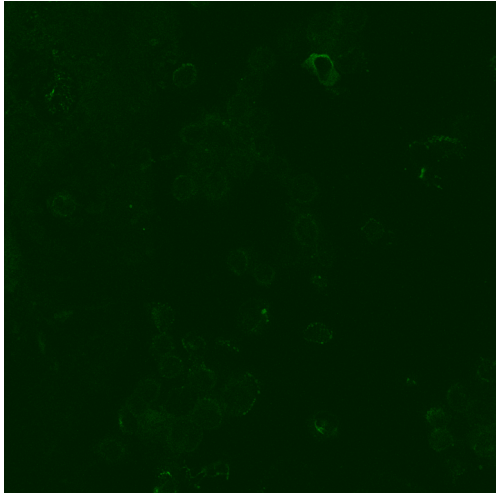
Abb. 3.21: Expression von S100β in G8.8⁺-mTEZ und UEA⁺-mTEZ. Immunhistologischer Nachweis von S100β in Zytospins. *A.* Blockade des Erstantikörpers mit freiem S100β eliminiert das Signal vollständig. *B.* Viele UEA⁺-mTEZ sind stark gefärbt, das Signal ist zytoplasmatisch. In allen betrachteten UEA⁺-mTEZ ist zumindest eine schwache Färbung erkennbar. *C.* UEA⁺-mTEZ weisen einen höheren Anteil stark gefärbter Zellen auf als G8.8⁺-mTEZ. *D.* Die stark gefärbten Zellen der G8.8⁺-Fraktion sind seltener. Die Balken entsprechen 10 μm in A und B und 20 μm in C und D.

3.3.2.5 Durch Immunfluoreszenz kann S100β in jeder betrachteten UEA⁺-mTEZ nachgewiesen werden.

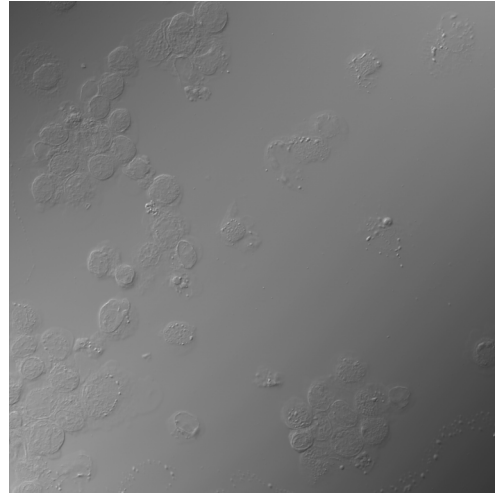
Auch hier wurden Fluoreszenz-Färbungen (mit einem Cy3-markierten Zweitantikörper) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert, und auch hier zeigte sich, dass die Immunhistologie mit den Daten der LSM korreliert (Abb. 3.22). Die Lokalisation der Färbung im Zytoplasma und die Frequenz der Zellen stimmt überein. Die Färbung ist, wie erwartet, im Zytoplasma lokalisiert und bildet charakteristische „c-förmige“ Strukturen im Innern der Zelle aus,

wie sie in Veröffentlichungen zur Charakterisierung von S100 β zu finden sind [101, 102]. Alle betrachteten Zellen exprimieren S100 β . Die Kontrollfärbung ist negativ.

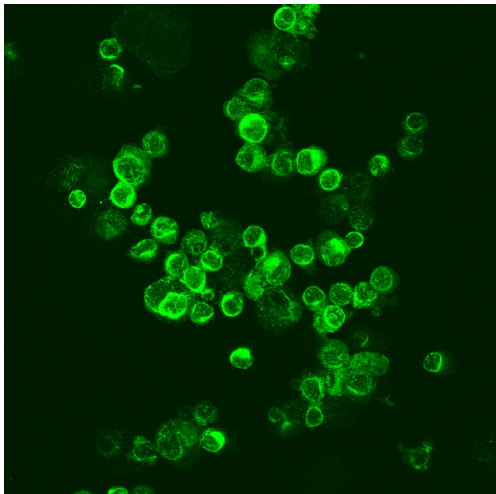
A



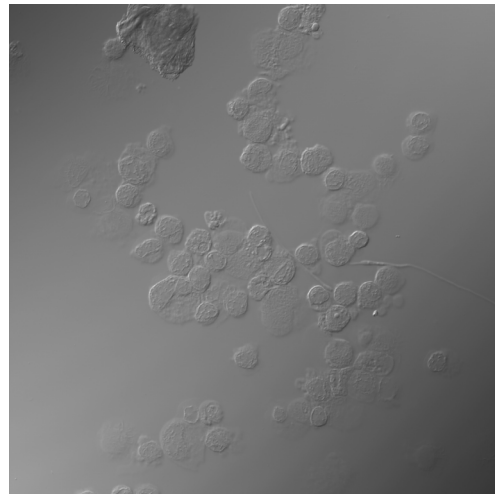
B



C



D



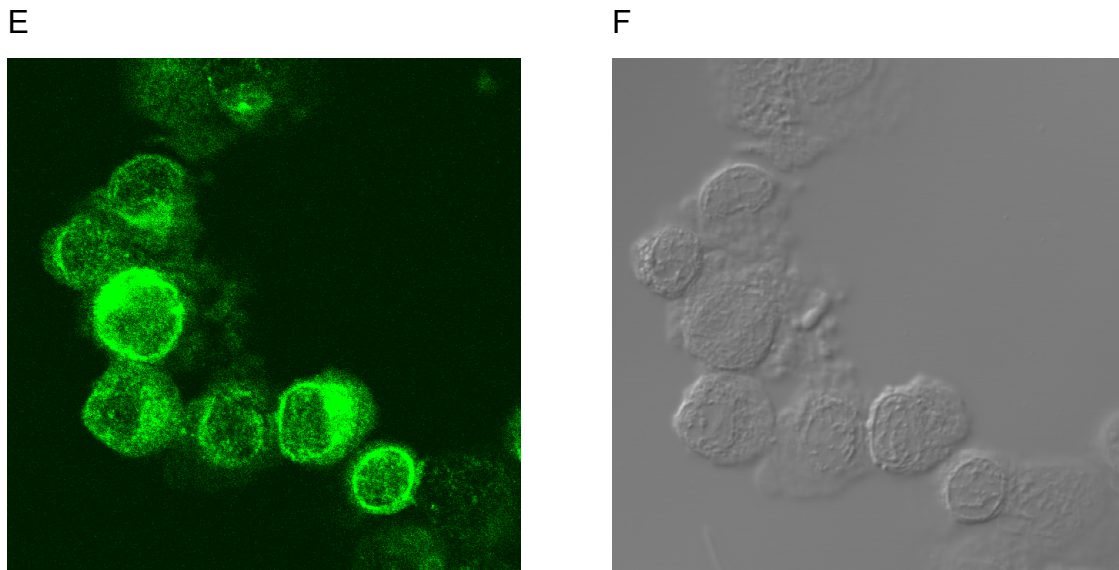


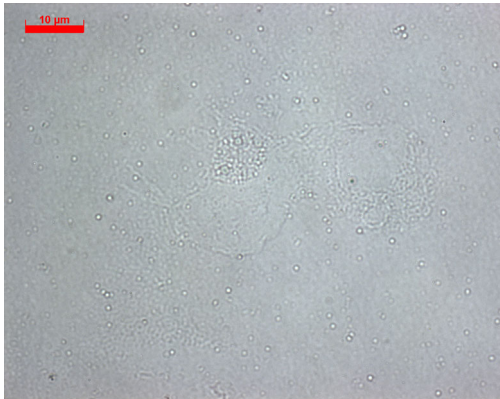
Abb. 3.22: Alle betrachteten UEA⁺-mTEZ sind positiv für S100β. Immunfluoreszenz für S100β auf UEA⁺-mTEZ-Zytospins. *A.* Das Signal lässt sich vollständig durch Blockade des Erstantikörpers mit freiem S100β eliminieren. *B.* DIC-Darstellung von *A.* *C.* Jede Zelle exprimiert zumindest geringe Mengen S100β. *D.* DIC-Darstellung von *C.* *E.* Das Signal liegt zytoplasmatisch vor und ist heterogen. Jede betrachtete Zelle ist zumindest schwach positiv, während einige Zellen sehr stark angefärbt sind. Die Ausschnitte entsprechen 250 μm (*A, B, C, D*) bzw. 80 μm (*E, F*).

3.3.2.6 S100β ist in tDC nicht nachweisbar

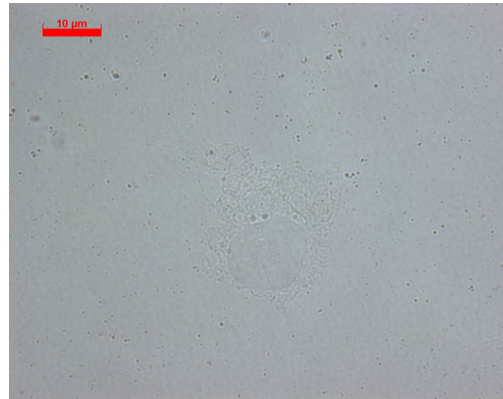
Auch für S100β ist in tDC mittels RT-PCR mRNA nachweisbar. Durch immunhistologische Methoden kann jedoch kein Signal erzielt werden (Abb. 3.23). Auch die Immunfluoreszenz zeigt kein spezifisches Signal. Die angefärbten Strukturen entsprechen ihrer Lage und Häufigkeit nach Zentriolen und sind, wahrscheinlich aufgrund ihrer Dichte, unspezifisch gefärbt. Dieselben Strukturen konnten auch in anderen Experimenten mit tDC und demselben Zweitantikörper, aber anderen Erstantikörpern gefunden werden.

Damit unterscheidet sich auch für S100β die Expression in tDC von der in medullären Epithelzellen.

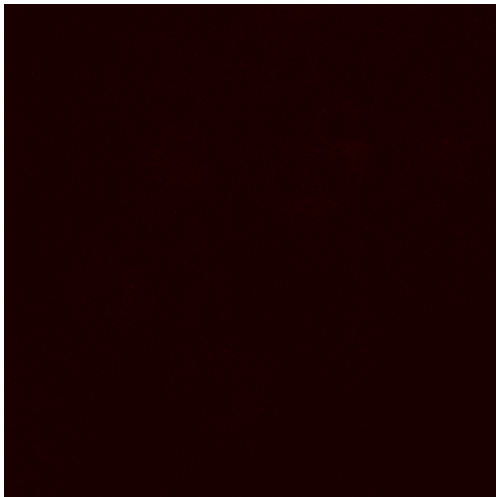
A



B



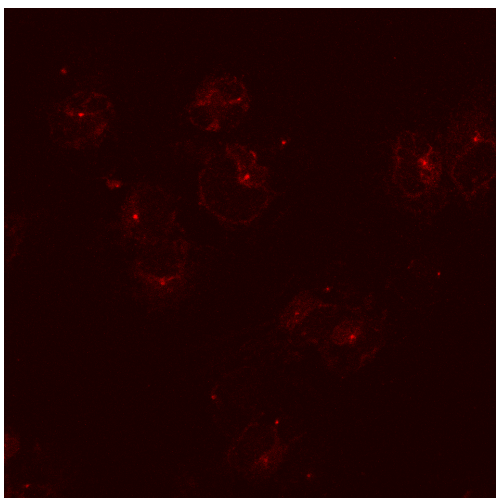
C



D



E



F



Abb. 3.23: S100 β ist in tDC nicht nachweisbar. Immunhistologischer und Immunfluoreszenz-Nachweis von S100 β in Zytospins von N418⁺-tDC. *A.* Immunhistologischer Nachweis, in der Kontrollfärbung ist kein Signal zu erkennen. *B.* S100 β ist in tDC mittels Immunhistologie nicht nachweisbar. *C.* Die Kontrollfärbung ist auch in der Fluoreszenzfärbung negativ. *D.* DIC-Darstellung von *C.* *E.* In der tDC-Fraktion werden Strukturen unspezifisch angefärbt, die ihrer Lokalisation in unmittelbarem Kontakt mit dem Zellkern nach Zentriole sind. *F.* Die DIC-Darstellung zeigt, dass die unspezifisch angefärbten Strukturen unmittelbar am Einschnitt des bohnenförmigen Zellkerns liegen. Die Balken entsprechen 10 μ m, die Bildausschnitte der Fluoreszenzfärbungen entsprechen 200 μ m.

3.3.2.7 Zusammenfassung

Die Expression von S100 β als Protein ist eine Eigenschaft der mTEZ und zu einem geringeren Anteil auch der kTEZ. In tDC ist S100 β nicht als Protein nachzuweisen. Die Expression in mTEZ und kTEZ ist heterogen, aber in allen betrachteten TEZ gefunden worden. Die intrazelluläre Verteilung in der Membran und im Zytoplasma entspricht der Verteilung von S100 β in Zellen des ZNS, die S100 β exprimieren. In der UEA⁺-Fraktion sind stark exprimierende Zellen häufiger, als in der G8.8⁺-Fraktion.

3.3.3 Detektion von Insulin

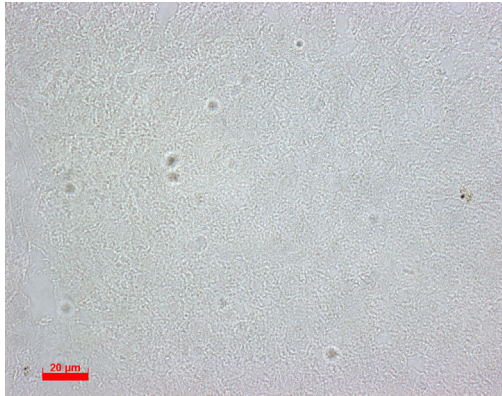
Das Peptidhormon Insulin ist ein wichtiger Autoantigen für Typ 1-Diabetes, es ist daher von Interesse, wie es als Protein im Thymus auf zellulärer Ebene exprimiert wird. Insulin-mRNA konnte bereits in Thymus-Gefrierschnitten nachgewiesen werden.

Das Serum gegen Insulin (Meerschweinchen gegen Schwein-Insulin, Dako) wurde auf Gefrierschnitten von Pankreas getestet. Auch hier wurden Sekundärantikörperkontrollen (nicht gezeigt) durchgeführt und zusätzlich Kontrollen erstellt, für die das gebrauchsfertig verdünnte Serum eine halbe Stunde lang mit 30 nM freiem Insulin (Schwein) inkubiert wurde, ehe es auf das Präparat gegeben wurde.

3.3.3.1 Insulin kann auf Pankreas-Gefrierschnitten nachgewiesen werden

Das Serum färbte spezifisch und mit freiem Insulin blockierbar die B-Zellen der Langerhansschen Inseln (Abb. 3.24).

A



B

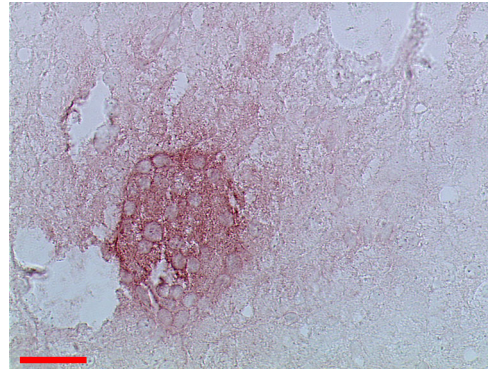


Abb. 3.24: Insulin kann in Langerhansschen Inseln des Pankreas nachgewiesen werden. Immunhistologischer Nachweis von Insulin auf Pankreas-Gefrierschnitten. Zweischrüttige, nicht verstärkte Färbung. *A.* Durch Blockade mit freiem Insulin wird das Signal vollständig eliminiert. *B.* B-Zellen der Langerhansschen Inseln sind anfärbbar. Die Balken entsprechen 20 µm in A und 40 µm in B.

Es zeigte sich, dass eine normale zweischrüttige Färbung wie in Abb. 3.24 nicht ausreichte, um Insulin auf UEA⁺-mTEZ nachzuweisen. Deshalb wurde das ABC-Kit von Vectorstain als Verstärkersystem verwendet. Dieses System funktioniert auf der Basis von Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexen, die die Farbreaktion um ein Vielfaches verstärken können. Auch mit diesem System konnte die Reaktion auf Pankreas-Gefrierschnitten noch mit 30 nM freiem Insulin blockiert werden, auch wenn die Reaktion auf dem sehr Insulin-reichen Pankreas-Gewebe deutlich zu stark ausfiel (Abb. 3.25). Deshalb wurde zusätzlich ein Avidin-Biotin-Blockierungsschritt eingeführt.

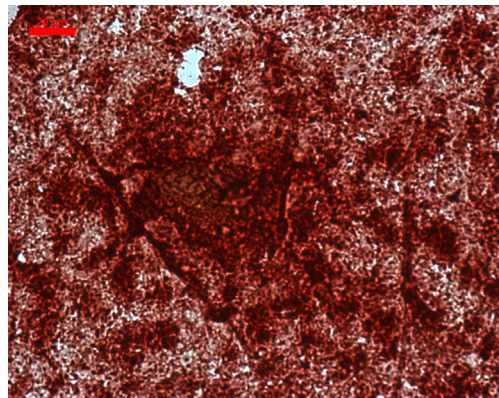
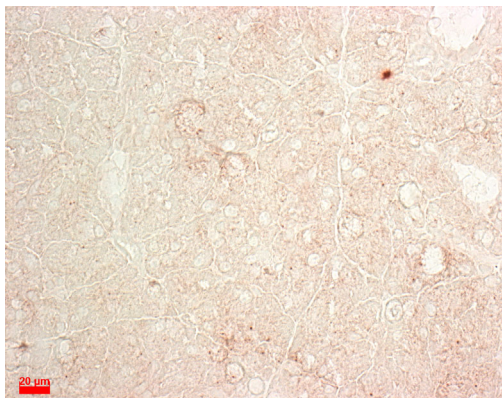
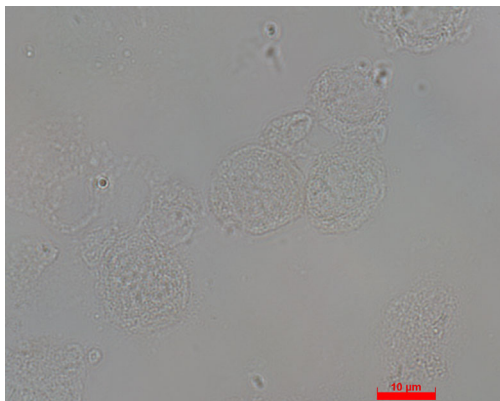


Abb. 3.25: Ein Verstärkersystem führt zur Überfärbung der Langerhansschen Zellen in Gefrierschnitten des Pankreas. Immunhistologischer Nachweis von Insulin auf Pankreas-Gefrierschnitten. Mit dem ABC-System verstärkte Färbung. A. Durch Blockade mit freiem Insulin kann die Reaktion weitgehend eliminiert werden. B. Der Einsatz des Verstärker-Kits führt zu einer deutlich zu starken Reaktion auf Pankreas-Gefrierschnitten. Auch die Umgebung der Langerhansschen Insel ist gefärbt. Die Balken entsprechen 20 μm .

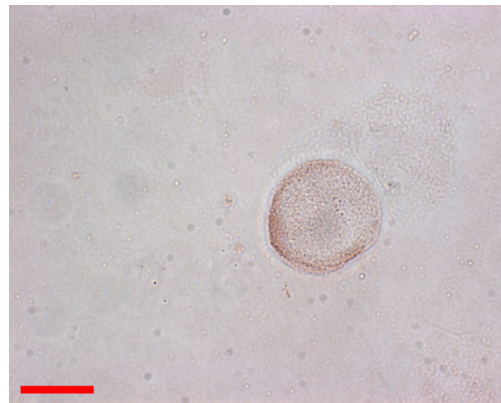
3.3.3.2 Insulin kann in UEA⁺-mTEZ nachgewiesen werden

Da die Färbeprozedur prinzipiell eine hohe Verstärkung bewirkt und blockierbar ist, wurde die Färbung mit Verstärkung mit dem ABC-Kit und zusätzlichem Avidin-Biotin-Blockierungsschritt auf UEA⁺-mTEZ durchgeführt. Nur wenige (<5%) Zellen sind deutlich angefärbt (Abb. 3.26). Bei hoher Vergrößerung zeigt sich, dass die übrigen Zellen sehr schwach angefärbt sind. Die Färbung ist im Zytoplasma lokalisiert und übertrifft die Hintergrundreaktion.

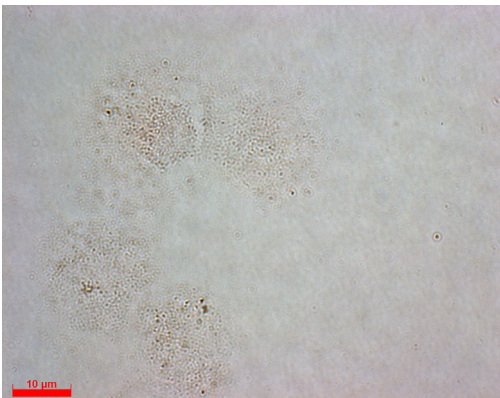
A



B



C



D

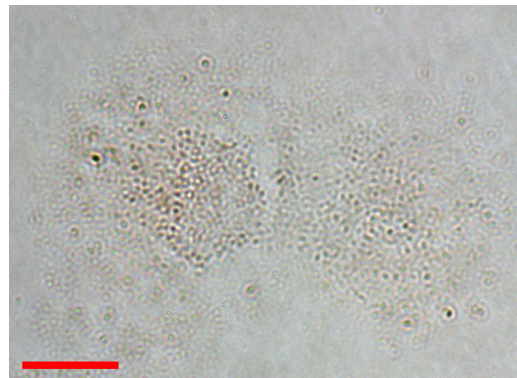


Abb. 3.26: Insulin ist schwach in allen UEA⁺-mTEZ nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von Insulin auf UEA⁺-mTEZ-Zytospins. Die Reaktion wurde mit dem ABC-Kit verstärkt und ein zusätzlicher Avidin-Biotin-Blockierungsschritt eingeführt. *A.* Blockade mit Insulin eliminiert das Signal vollständig. *B.* Seltene (<5%) Zellen sind stärker angefärbt. *C.* In allen betrachteten Zellen ist eine sehr schwache Färbung festzustellen, die aber die Hintergrundreaktion übertrifft. *D.* Die schwache Färbung übertrifft die Kontrollen. Die Färbung liegt in allen Fällen im Zytoplasma vor. Die Balken entsprechen 10 µm in A, B, C und 5 µm in D.

Auf Thymusschnitten und kortikalem Epithel konnte die Färbung aufgrund von Kreuzreaktivitäten und zu starken Hintergrundreaktionen nicht etabliert werden. G8.8⁺-Zellen können mit der Methode nicht analysiert werden, da der Zweitantikörper mit dem zur Isolierung der Zellen im FACS verwendeten Antikörper kreuzreagiert.

3.3.3.3 Insulin ist in tDC nicht nachweisbar

Auf Zytospins von N418⁺-tDC konnte Insulin nicht nachgewiesen werden. Sowohl die Kontrolle als auch die Färbung liefern kein Signal (Abb. 3.27). Dies stimmt mit RT-PCR-Befunden überein, dort konnte keine mRNA für Insulin gefunden werden [69].

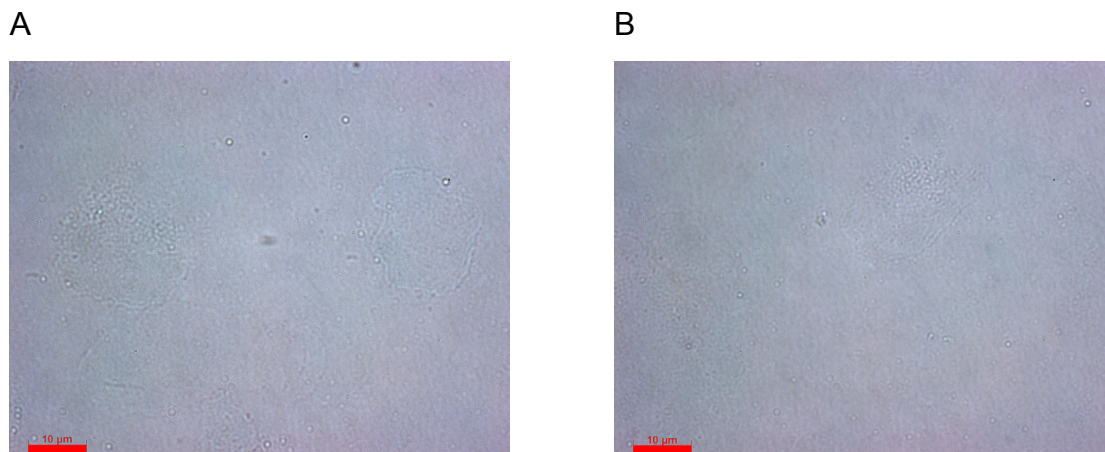


Abb. 3.27: Insulin kann in tDC nicht nachgewiesen werden. Immunhistologischer Nachweis von Insulin auf N418⁺-tDC-Zytospins. Die Kontrolle (Blockade mit Insulin) ist negativ (A), ebenso wie die unblockte Färbung (B). Die Balken entsprechen 10 µm.

3.3.3.4 Zusammenfassung

Insulin-Expression konnte in mTEZ gezeigt werden. Sie ist in sehr wenigen Zellen etwas stärker, jedoch ist eine schwache positive Färbung für alle betrachteten Zellen nachzuweisen. Die

Färbung ist, wie für Insulin typisch, zytosolisch. In tDC konnte keine Insulinexpression nachgewiesen werden.

3.3.4 Detektion von Somatostatin

Es gibt zwei biologisch aktive Somatostatin-Peptide, die aus einem Propeptid entstehen. Somatostatin-14 wird vor allem im Zwölffingerdarm, im Nervengewebe des Darmtrakts sowie im Hypothalamus produziert. In den D-Zellen der Langerhansschen Inseln herrscht Somatostatin-28 vor, das deshalb in diesen Versuchen ausgewählt wurde [104, 105]. Seine genaue Rolle ist noch unklar, es inhibiert unter anderem Somatotropin [103]. Somatostatin-mRNA ist ebenfalls in mTEZ gefunden worden.

Das Serum (Kaninchen gegen ein synthetisches Peptid aus humanem Somatostatin) gegen Somatostatin wurde wie das Serum gegen Insulin auf Gefrierschnitten von Pankreas getestet. Als Negativkontrolle diente zunächst die Sekundärkontrolle (nicht gezeigt). Auch hier wurden zusätzlich Kontrollen erstellt, für die das gebrauchsfertig verdünnte Serum eine halbe Stunde lang mit 30 nM freiem Somatostatin-Peptid inkubiert wurde, ehe es auf das Präparat gegeben wurde.

3.3.4.1 Somatostatin ist auf Pankreas-Gefrierschnitten detektierbar

Das Serum färbte spezifisch die D-Zellen des Pankreas an. Die Reaktion ist mit freiem Antigen blockierbar (Abb. 3.28).

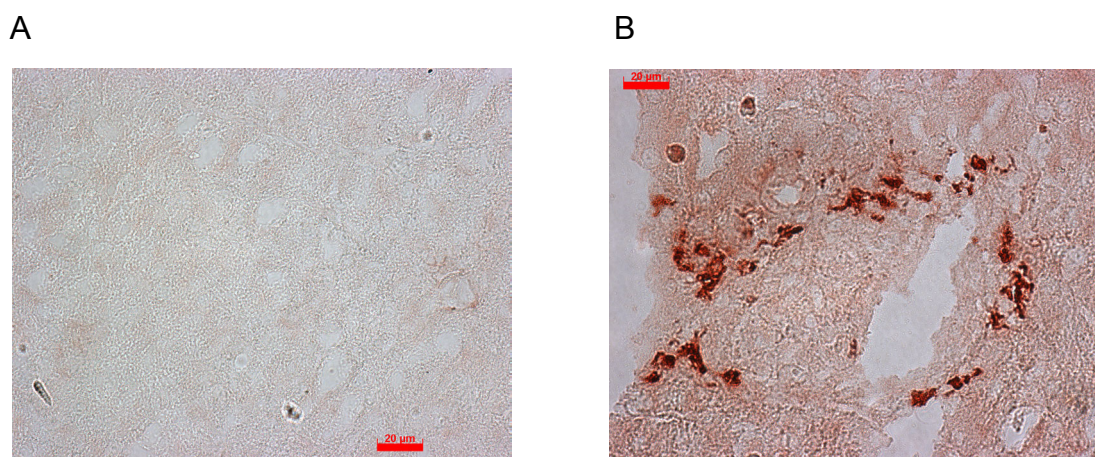


Abb. 3.28: Somatostatin ist in D-Zellen der Langerhansschen Inseln anfärbbar. Immunhistologischer Nachweis von Somatostatin in Gefrierschnitten des Pankreas. A. Das Signal ist durch Blockierung des Erstantikörpers mit freiem Somatostatin eliminierbar. B. Somatostatin kann in den D-Zellen der Langerhansschen Inseln angefärbt werden. Die Balken entsprechen 20 µm.

Auf Thymus-Gefrierschnitten konnte wegen starker unspezifischer Reaktionen keine immuhi-

stologische Färbung etabliert werden. Daher wurde versucht, Somatostatin in TEZ nachzuweisen.

3.3.4.2 Somatostatin ist in mTEZ nachweisbar, in kTEZ jedoch nicht

Es zeigte sich eine deutliche, blockierbare und spezifische Färbung in UEA⁺-mTEZ (Abb. 3.29). Alle Zellen sind geringfügig angefärbt, einige (etwa 5%) davon sehr stark. Das Signal liegt im Zytoplasma vor.

G8.8⁺-mTEZ konnten aufgrund starker unspezifischer Reaktionen nicht analysiert werden.

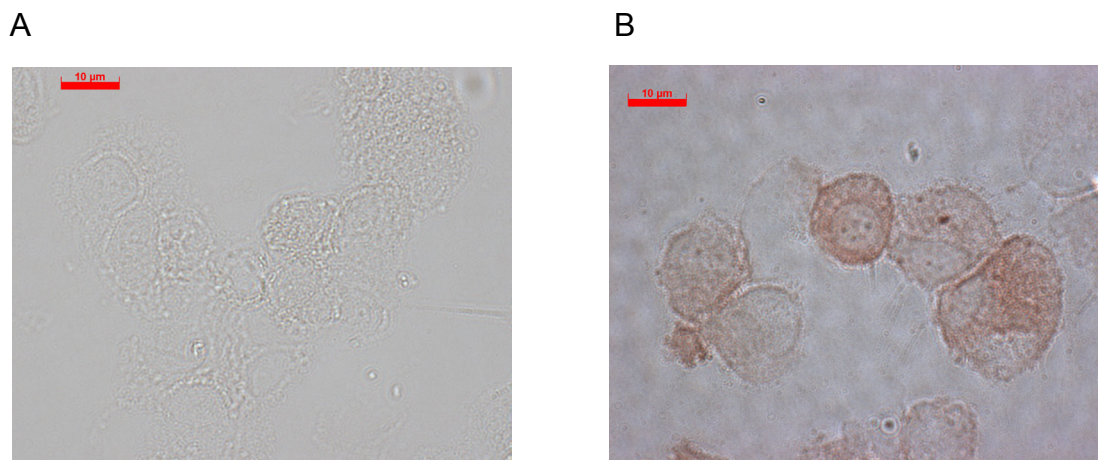
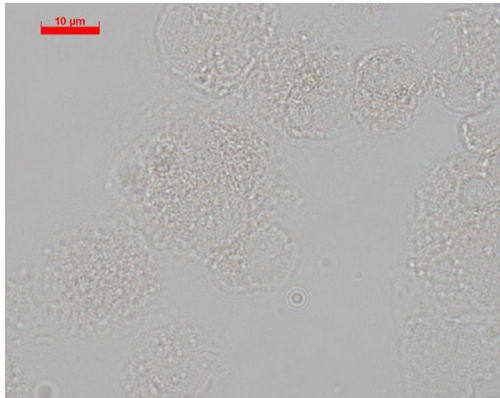


Abb. 3.29: Somatostatin kann in UEA⁺-mTEZ nachgewiesen werden. Immunhistologischer Nachweis von Somatostatin auf UEA⁺-mTEZ-Zytospins. *A.* Durch Blockade mit Somatostatin-Peptid kann das Signal vollständig eliminiert werden. *B.* Somatostatin ist in mTEZ nachweisbar. Die Färbung ist heterogen, einige Zellen sind stärker angefärbt. In allen betrachteten mTEZ kann Somatostatin nachgewiesen werden. Die Balken entsprechen 10 µm.

kTEZ zeigen keine Färbung für Somatostatin, die die Hintergrundreaktion überschreitet (Abb. 3.30), obwohl mittels RT-PCR mRNA für Somatostatin nachgewiesen werden konnte [69].

A



B

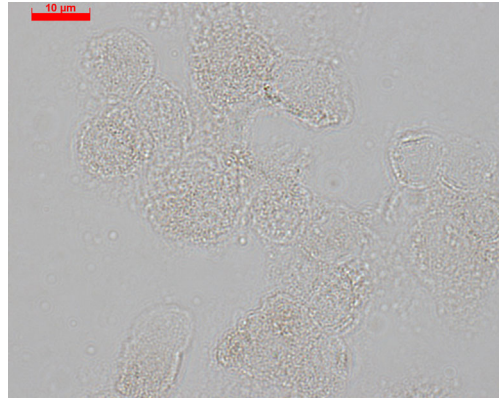
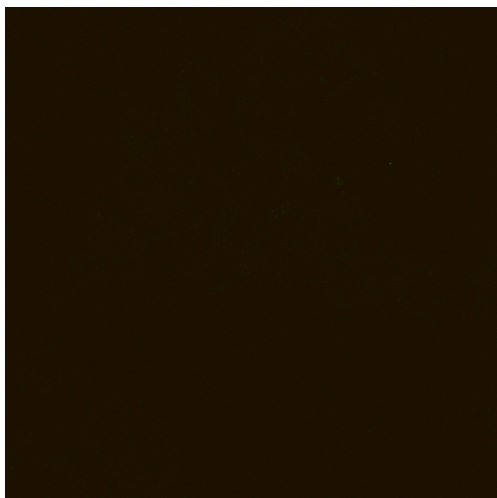


Abb. 3.30: Somatostatin ist in kTEZ nicht nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von Somatostatin auf CDR1⁺-kTEZ-Zytospins. Es ist kein Signal für Somatostatin nachweisbar, das über die Hintergrundfärbung hinausgeht (A, B). Die Balken entsprechen 10 µm.

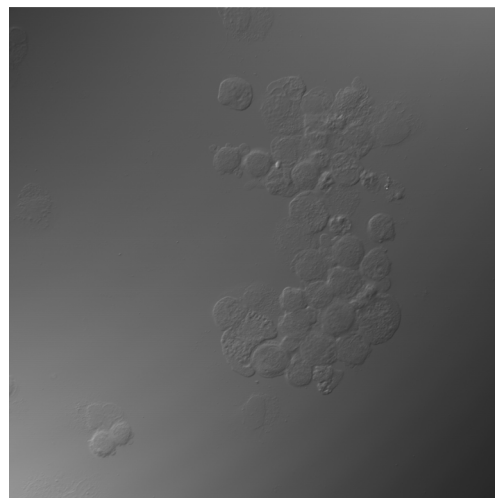
3.3.4.3 Mittels Immunfluoreszenz kann Somatostatin in jeder betrachteten UEA⁺-mTEZ nachgewiesen werden.

Auch diese Färbung ließ sich mit Cy3-gekoppelten Zweitantikörpern durchführen. Die Fluoreszenz-Färbung stimmt mit den aus der Immunhistologie gewonnenen Daten überein und ist ebenfalls zytoplasmatisch (Abb. 3.31). Die Immunfluoreszenz ist blockierbar.

A



B



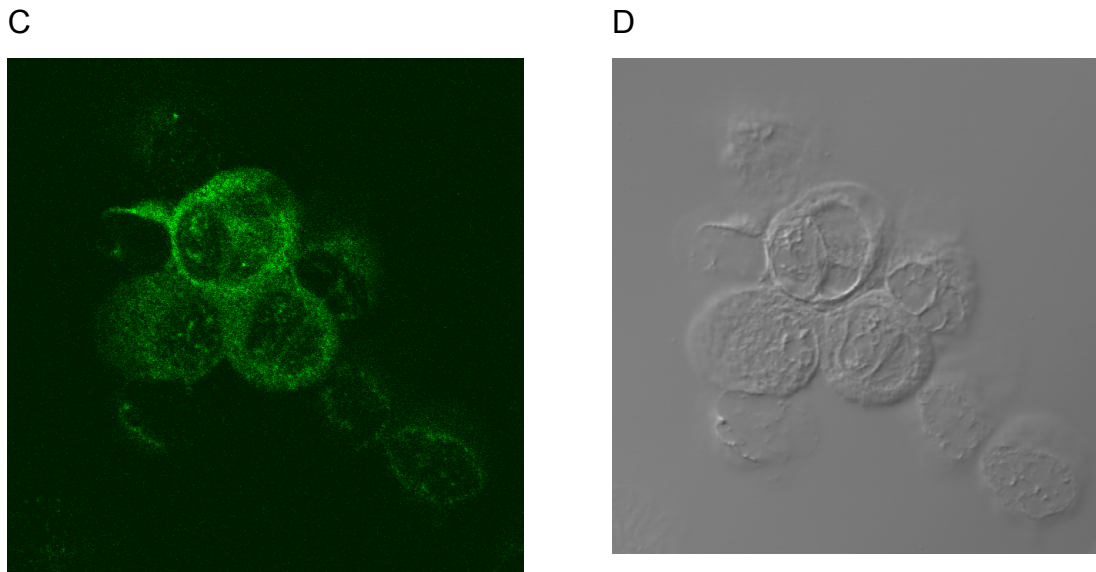


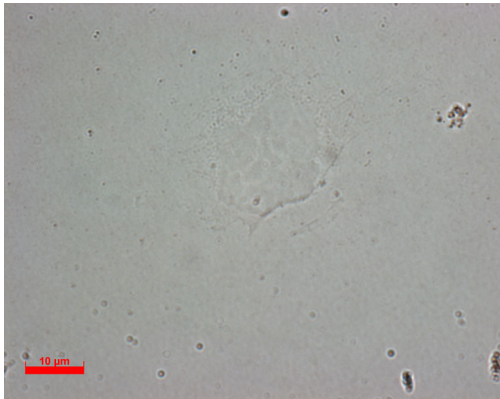
Abb. 3.31: Somatostatin ist in allen UEA⁺-mTEZ nachweisbar. *A.* Kontrolle, Primärantikörper wurde mit freiem Somatostatin-Peptid blockiert. *B.* DIC-Darstellung von *A.* *C.* Das Signal für Somatostatin ist zytoplasmatisch, alle Zellen sind positiv. *D.* DIC-Darstellung von *C.* Die Ausschnitte entsprechen 200 µm in *A* und *B*, 50 µm in *C* und *D*.

Auch hier zeigt sich, dass fast alle Zellen mit dem Serum spezifisch angefärbt werden können. Wenige Zellen (<5%) sind etwas stärker anfärbbar, die meisten Zellen zeigen eine schwache Anfärbung. Da diese Färbung eliminiert werden kann, wenn das Antiserum mit freiem Antigen inkubiert wird, ist diese Färbung spezifisch und auf die Anwesenheit von Somatostatin zurückzuführen.

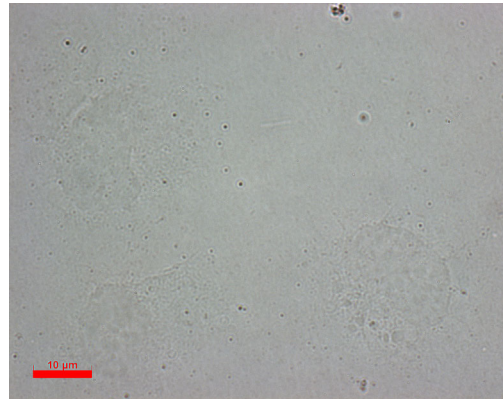
3.3.4.4 Somatostatin ist in tDC nicht nachweisbar

Weder durch immunhistologische Methoden noch mittels Immunfluoreszenz konnte Somatostatin in tDC nachgewiesen werden (Abb. 3.32). Die kleinen Strukturen, die im Zytoplasma in der Nähe des Kerns angefärbt werden, sind nach Struktur und Anzahl offenbar Zentriole, die Antikörper unspezifisch binden.

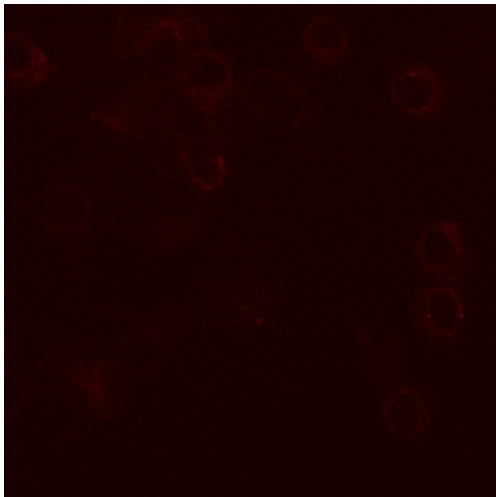
A



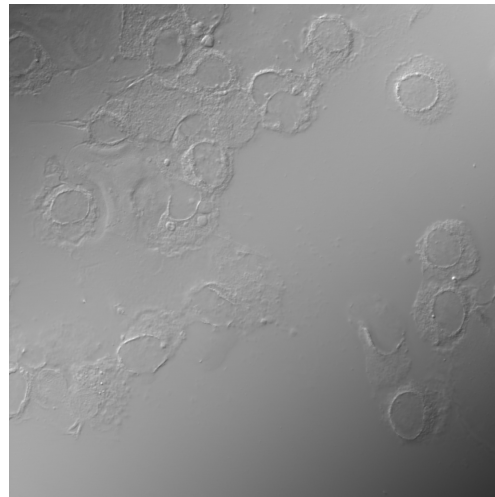
B



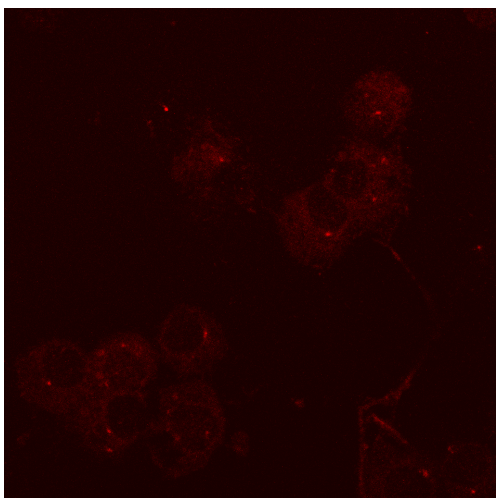
C



D



E



F

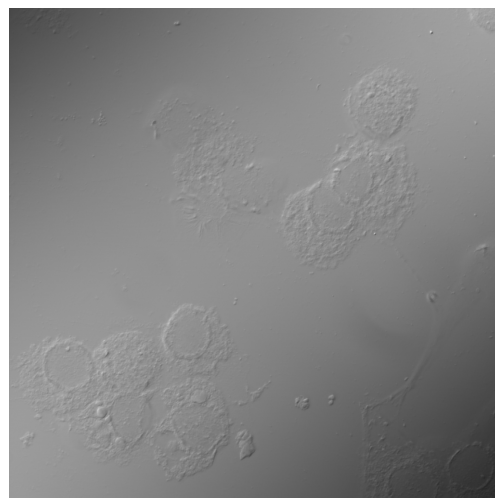


Abb. 3.32: Somatostatin kann in tDC nicht nachgewiesen werden. Immunhistologischer Nachweis von Somatostatin auf N418⁺-tDC-Zytospins. *A.* Nach Blockade des Erstantikörpers mit freiem Somatostatin-Peptid ist kein Signal detektierbar. *B.* Auch die unblockierte Reaktion liefert kein Signal. Immunfluoreszenznachweis von Somatostatin auf N418⁺-tDC-Zytospins. *C.* Nach Blockade des Erstantikörpers mit freiem Somatostatin-Peptid ist nur ein schwaches Hintergrundsignal detektierbar. *D.* DIC-Darstellung von *C.* *E.* Das Signal liegt nicht signifikant über dem der Kontrolle. Die angefärbten Strukturen sind nach Anzahl und Lage in Kernnähe vermutlich Zentriole. Die Ausschnitte stellen 200 µm dar, die Balken entsprechen 10 µm.

3.3.4.5 Zusammenfassung

Somatostatin ist in allen betrachteten UEA⁺-mTEZ detektierbar, nicht jedoch in kTEZ und tDC. Die Somatostatin-Expression auf Proteinebene ist also eine Eigenschaft der mTEZ. Die Färbung ist leicht heterogen, wenige Zellen sind etwas stärker anfärbbar als die übrigen Zellen. Das intrazelluläre Färbemuster entspricht der Expression, wie sie für Somatostatin bekannt ist.

3.3.5 Detektion von P1A

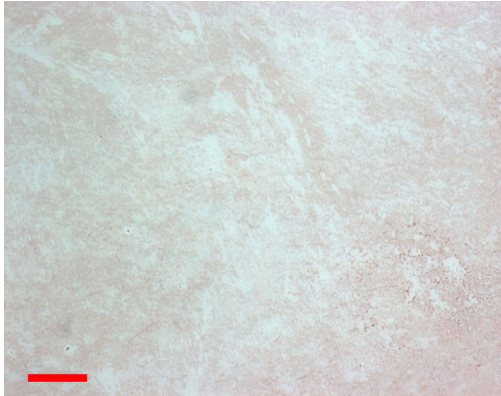
P1A wird in manchen Tumoren, aber auch in Hoden (in Spermatogonien) und in der Plazenta exprimiert [91, 106]. Es ist 40 kDa groß, 224 AS lang und intrazellulär lokalisiert. Es ist vermutlich an Membranen des ER gebunden. Als Antigen, das in Geweben vorkommt, die vom Immunsystem „ignoriert“ werden, und gegen das Toleranz deshalb nicht komplett sein könnte, ist von Interesse, ob es ebenfalls im Thymus exprimiert wird und zur Induktion von zentraler Toleranz führt. Da P1A auch ein Tumorantigen darstellt, könnte eine nicht völlig komplette Toleranzinduktion gegen P1A für seine Verwendung als Zielantigen in der Immuntherapie für Krebs sprechen.

Um P1A zu detektieren, wurde ein Kaninchenserum verwendet. Für die Kontrollen wurde der Erstantikörper durch Präimmunsereum ersetzt, außerdem wurden Sekundärantikörperkontrollen durchgeführt, die negativ waren und hier nicht gezeigt werden.

3.3.5.1 P1A kann im Hoden nachgewiesen werden

Das Kaninchen-Immunsereum wurde auf Gefrierschnitten von Hoden getestet. Es zeigt sich, dass der Antikörper wie erwartet spezifisch Spermatogonien anfärbt (Abb. 3.33). Als Kontrolle ist der entsprechende Versuch mit Präimmunsereum gezeigt.

A



B



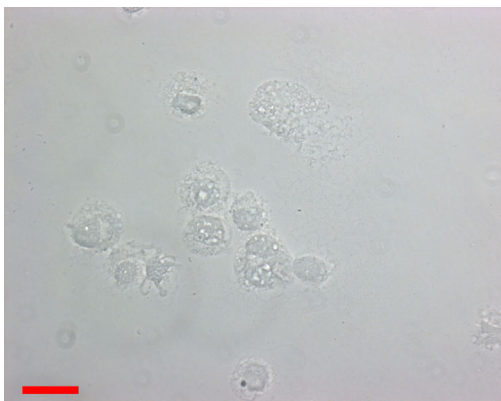
Abb. 3.33: P1A ist in Spermatogonien des Hodens nachweisbar. Gefrierschnitt durch Hoden einer jungen Maus (3 Wochen), immunhistologischer Nachweis von P1A. *A.* Die Kontrolle (Präimmunserum) ist negativ. *B.* P1A ist in den Spermatogonien detektierbar, die in den äußersten Schichten der Samenkanälchen liegen. Die Balken entsprechen 100 μm .

Die Spezifität des Serums ist damit gezeigt.

3.3.5.2 P1A ist in mTEZ, aber nicht in kTEZ nachweisbar

Wenige G8.8^+ -mTEZ (etwa 5%) sind für P1A stark positiv. Aber auch hier zeigt sich, dass alle betrachteten mTEZ zumindest schwach für P1A positiv sind. Die Hintergrundreaktion ist vernachlässigbar gering (Abb. 3.34).

A



B

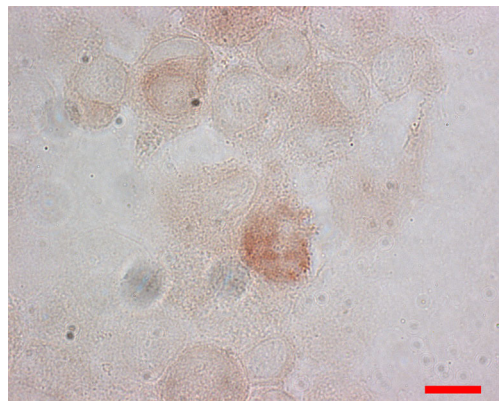
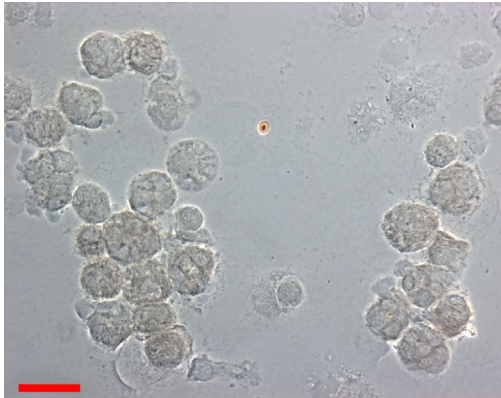


Abb. 3.34: P1A ist in allen betrachteten G8.8^+ -mTEZ nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von P1A auf G8.8^+ -mTEZ. *A.* Die Kontrolle (Präimmunserum) liefert kein Signal. *B.* Alle betrachteten G8.8^+ -mTEZ sind zumindest schwach positiv. Wenige (etwa 5%) mTEZ sind stark gefärbt. Die Färbung ist zytoplasmatisch und liegt in kleinen Granula vor. Die Balken entsprechen 50 μm in A und 10 μm in B.

Auf kTEZ reagiert das Serum unspezifisch mit den kortikalen Epithelzellen (Abb. 3.35). Eine spezifische Färbung ist deshalb nicht von der Hintergrundfärbung zu unterscheiden. Stark exprimierende Zellen, die sich vom Hintergrund hätten abheben können, konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

A



B

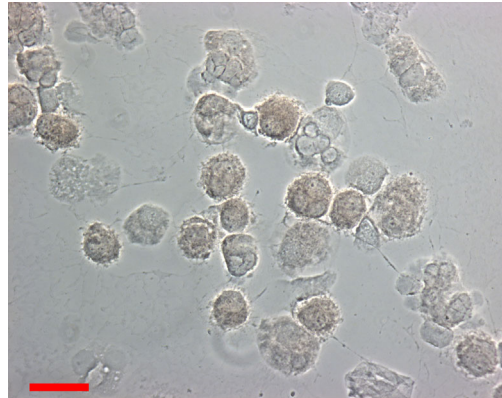
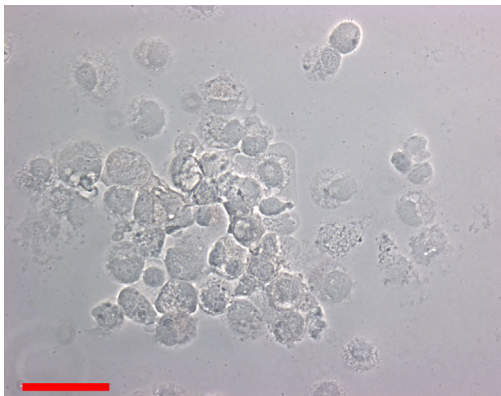


Abb. 3.35: P1A ist in kTEZ nicht nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von P1A auf kTEZ-Zytoplasten. Es ist kein Unterschied zwischen der Hintergrundreaktion (A) und der Färbung (B) zu erkennen. Das Serum reagiert offenbar schwach unspezifisch mit den kTEZ. Die Balken entsprechen 20 µm.

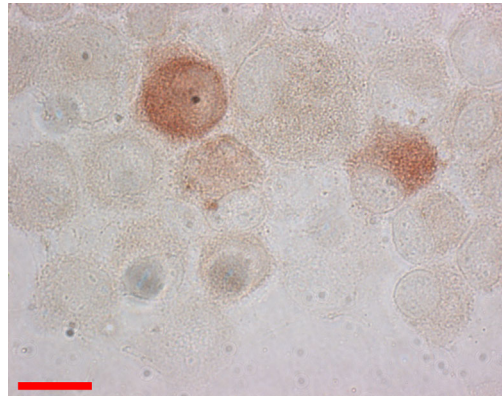
3.3.5.3 Das Expressionsmuster von UEA⁺- und G8.8⁺-mTEZ unterscheidet sich nicht

Auch auf UEA⁺-mTEZ können einige Zellen (5-10%) stark angefärbt werden, während viele andere erst bei hoher Vergrößerung braune Granula im Zytoplasma zeigen (Abb. 3.36). Die Kontrollen sind ungefärbt. Dasselbe Verteilungsmuster konnte auch bei G8.8⁺-mTEZ beobachtet werden.

A



B



C

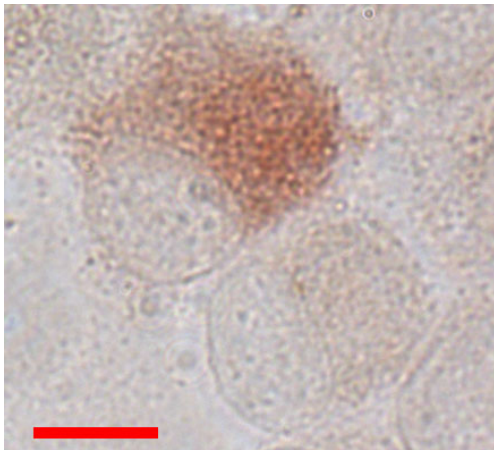
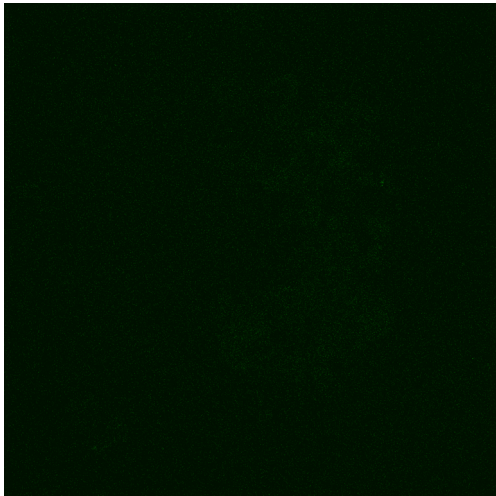


Abb. 3.36: Alle betrachteten UEA⁺-mTEZ sind zumindest schwach für P1A positiv, wenige Zellen sind stark angefärbt. Immunhistologischer Nachweis von P1A auf UEA⁺-mTEZ-Zytospins. *A.* Die Kontrolle (Präimmunserum) ist negativ. *B* und *C.* In allen mTEZ sind braune Granula im Zytoplasma zu erkennen, während wenige (5%) stark angefärbt sind. Die Balken entsprechen 50 µm (*A*) bzw. 10 µm (*B*) und 5 µm (*C*).

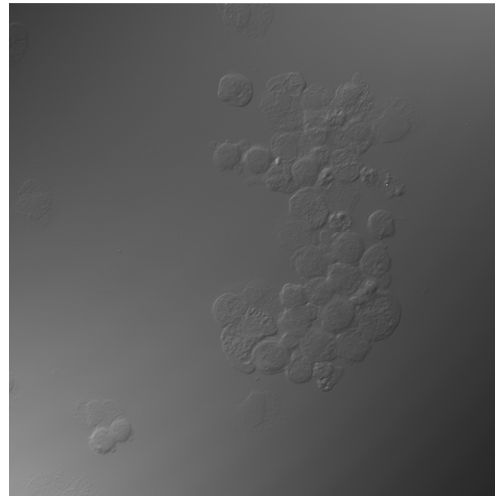
3.3.5.4 Mittels Immunfluoreszenz kann P1A in jeder betrachteten UEA⁺-mTEZ detektiert werden.

Auch in der Immunfluoreszenz (Cy3-gekoppelter Zweitantikörper) zeigt sich, dass wenige Zellen stark exprimieren, während die meisten Zellen schwächer, aber trotzdem deutlich angefärbt sind (Abb. 3.37). Die vesikuläre Verteilung des P1A im Zytoplasma wird besonders deutlich. Das Präimmunserum bindet nicht an UEA⁺-mTEZ. Die Färbung, die mit dem Antiserum erzielt wird, ist also spezifisch.

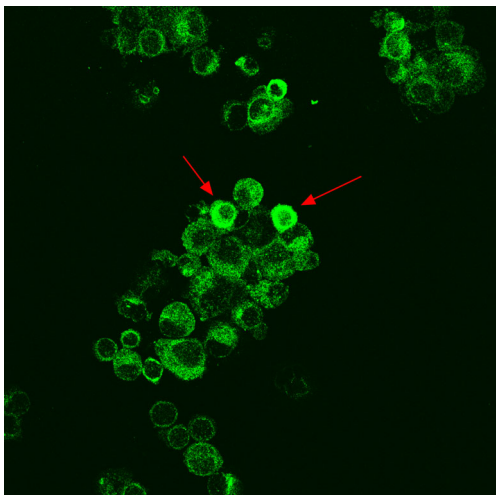
A



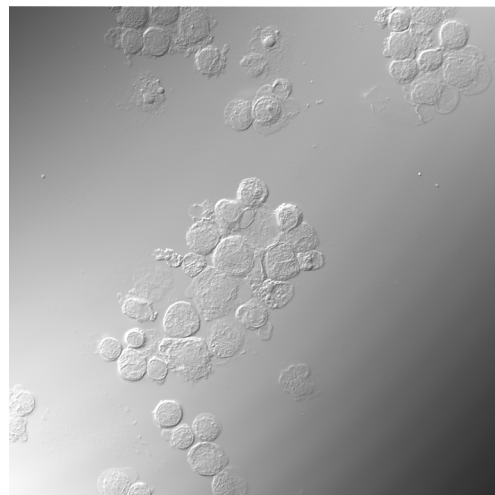
B



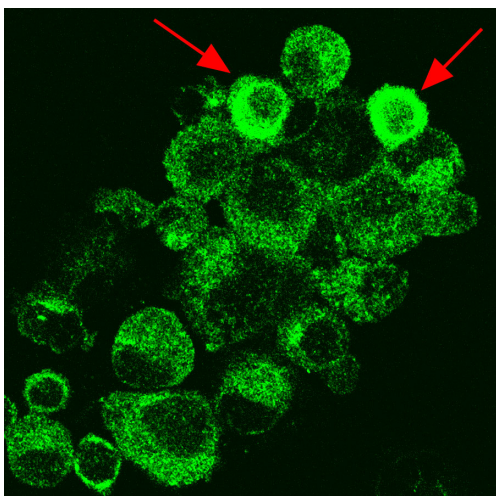
C



D



E



F

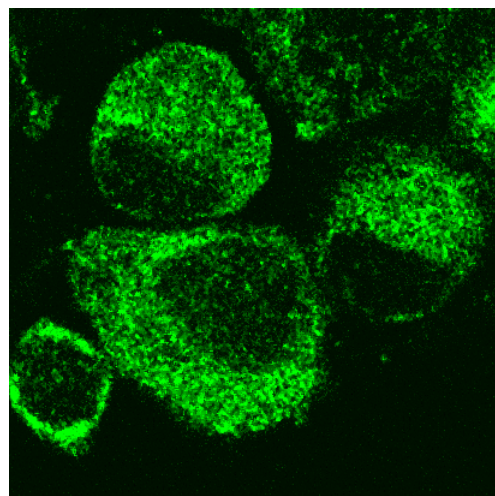
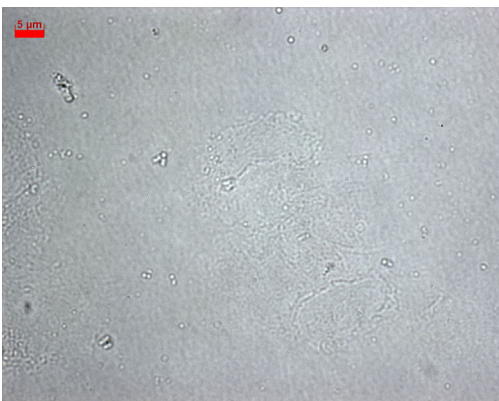


Abb. 3.37: P1A wird in jeder betrachteten UEA⁺-mTEZ exprimiert. Immunfluoreszenznachweis für P1A auf UEA⁺-mTEZ-Zytospins. *A.* Die Kontrolle (Präimmunserum) zeigt kein Signal. *B.* DIC-Darstellung von *A.* *C.* Wenige UEA⁺-mTEZ sind stark positiv (Pfeil), die anderen sind gering, aber deutlich gefärbt. *D.* DIC-Darstellung von *C.* *E.* Stark exprimierende Zellen (Pfeil) setzen sich deutlich gegenüber den schwach gefärbten Zellen ab. *F.* Aber auch die schwach gefärbten Zellen sind deutlich positiv. Das Signal ist im Zytoplasma erkennbar. Die Ausschnitte entsprechen 200 μm (*A, B, C, D*), 100 μm (*E*) und 30 μm (*F*)

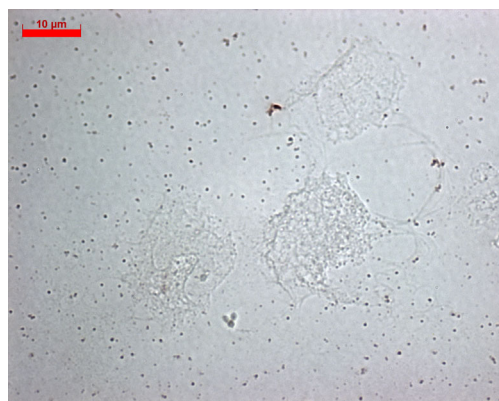
3.3.5.5 P1A kann in tDC nicht nachgewiesen werden

Auch hier ist von Interesse, ob das Expressionsmuster von P1A in tDC dem in mTEZ gleicht, da P1A-mRNA sehr schwach exprimiert in tDC gefunden worden ist und auch P1A somit Teil des hämatopoetischen Selbst sein könnte. Es zeigte sich, dass P1A nicht in tDC nachgewiesen werden kann (Abb. 3.38).

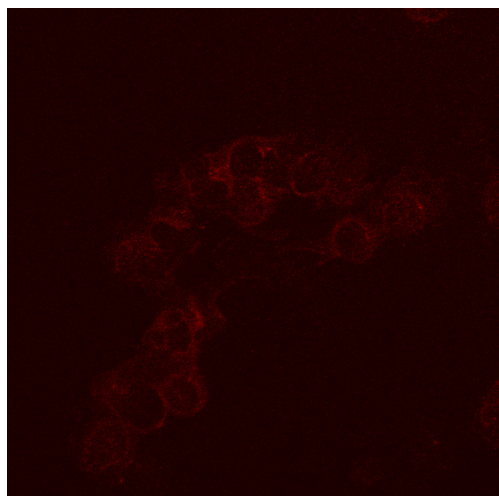
A



B



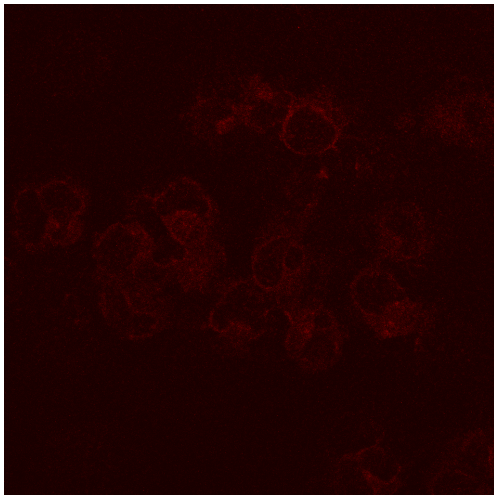
C



D



E



F



Abb. 3.38: P1A kann nicht in tDC nachgewiesen werden. Immunhistologisch ist P1A in tDC nicht nachzuweisen. *A.* Die Kontrolle (Präimmunserum) ist negativ. *B.* Auch in der Färbung mit Erstantikörper ist kein Signal zu erkennen. Mittels Immunfluoreszenz kann kein spezifisches Signal erzeugt werden. *C.* Die Kontrolle (Präimmunserum) weist eine leichte Hintergrundfluoreszenz auf. *D.* DIC-Darstellung von *C.* *E.* Die Färbung mit Erstantikörper erzeugt kein über den Hintergrund hinausgehendes Signal. *F.* DIC-Darstellung von *E.* Die Balken in *A* und *B* entsprechen 10 μm , die Ausschnitte in den übrigen Abbildungen entsprechen 200 μm .

3.3.5.6 Zusammenfassung

Die Expression von P1A als Protein ist eine Eigenschaft der mTEZ. P1A kann in tDC und kTEZ nicht nachgewiesen werden. Die Expressionsmuster von G8.8⁺- und UEA⁺-mTEZ gleichen sich. Das P1A-Signal liegt in Vesikeln im Zytoplasma vor und entspricht damit der bekannten Verteilung von P1A.

3.3.6 Detektion von MOG

Das Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) stellt beim Menschen nur etwa 0,5-1% des Gesamtmyelins (Anteil von PLP am Myelin: 50%). Es ist 247 AS bzw. 54 kDa groß und ein integrales Membranprotein in Oligodendrozyten. Trotz seines geringen Anteils am Gesamtmyelin spielt es bei vielen Tierarten und auch beim Menschen möglicherweise eine wichtige Rolle als Autoantigen: Autoantikörper gegen MOG spielen eine Rolle bei der Autoimmunerkrankung EAE, einem Tiermodell für MS, und offenbar auch bei MS selbst. In Ratten können Autoantikörper gegen MOG die Demyelinisierung in Gang setzen und eine der MS beim Menschen sehr ähnliche Immunpathologie hervorrufen [107]. In Mäusen ist der Entzündungspro-

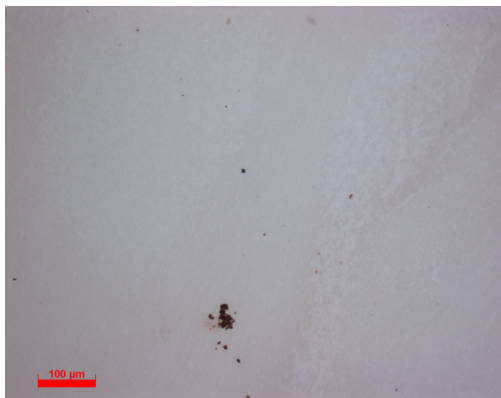
zess während der EAE zwar unabhängig von MOG, sind jedoch Antikörper gegen MOG vorhanden, nimmt die EAE einen schwereren Verlauf. Beim Menschen schließlich sind in einigen Patienten ebenfalls MOG-Autoantikörper zu finden und möglicherweise an der Demyelinisierung beteiligt [108]. Diese Eigenschaft als Autoantigen macht MOG, ebenso wie PLP, als Antigen für Expressionsstudien im Thymus interessant.

MOG wurde mit einem monoklonalen Antikörper (Maus IgG, 8.18C5) nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente in diesem Fall die Sekundärantikörperkontrolle.

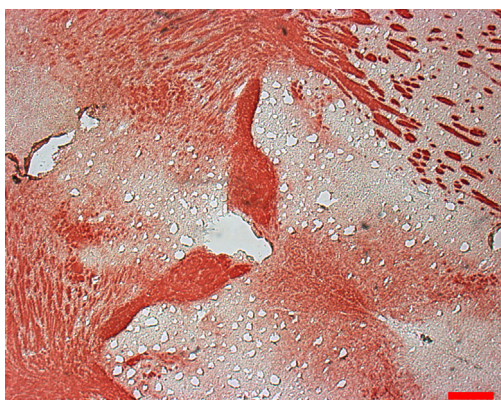
3.3.6.1 MOG kann in Gehirnschnitten nachgewiesen werden

Da MOG im ZNS in den Myelinscheiden vorkommt, ist zu erwarten, dass der Antikörper die weiße Substanz anfärbt (Abb. 3.39). Die Sekundärantikörperkontrolle ist negativ.

A



B



C

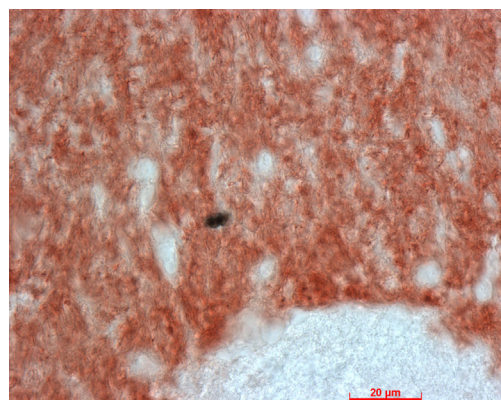


Abb. 3.39: MOG ist in Gehirn-Gefrierschnitten nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von MOG in Gefrierschnitten des Gehirns. *A.* Die Sekundärantikörperkontrolle ist ungefärbt. *B.* Die weiße Substanz lässt sich mit dem 8.18C5-Antikörper anfärben. *C.* Die faserige Struktur der Myelinummantelten Neuronen wird in der Vergrößerung deutlich. Die Balken entsprechen 100 μm (A), 250 μm (B) und 20 μm (C).

3.3.6.2 MOG ist auf G8.8⁺-mTEZ nicht nachweisbar

Auf UEA⁺-mTEZ konnte keine Färbung etabliert werden, da zum Nachweis des α -MOG-Antikörpers ein α -Maus-IgG-Zweitantikörper notwendig wäre. Dieser Antikörper würde jedoch auch gegen den Maus IgG- α -FITC-Antikörper reagieren, an den die MACS-Beads gekoppelt sind.

Da aber G8.8⁺-mTEZ mittels Antikörpern aus Ratte sortiert werden, tritt dieses Problem bei ihnen nicht auf. Die Sekundärreaktion ist vernachlässigbar gering. Allerdings konnte auf G8.8⁺-mTEZ trotzdem keine Färbung etabliert werden, die über diese schwache Hintergrundreaktion hinausging (Abb. 3.40). Eine mögliche Expression liegt also unterhalb der Nachweisgrenze des Assays. RT-PCR-Daten weisen darauf hin, dass MOG in mTEZ auf mRNA-Ebene schwach exprimiert wird [69].

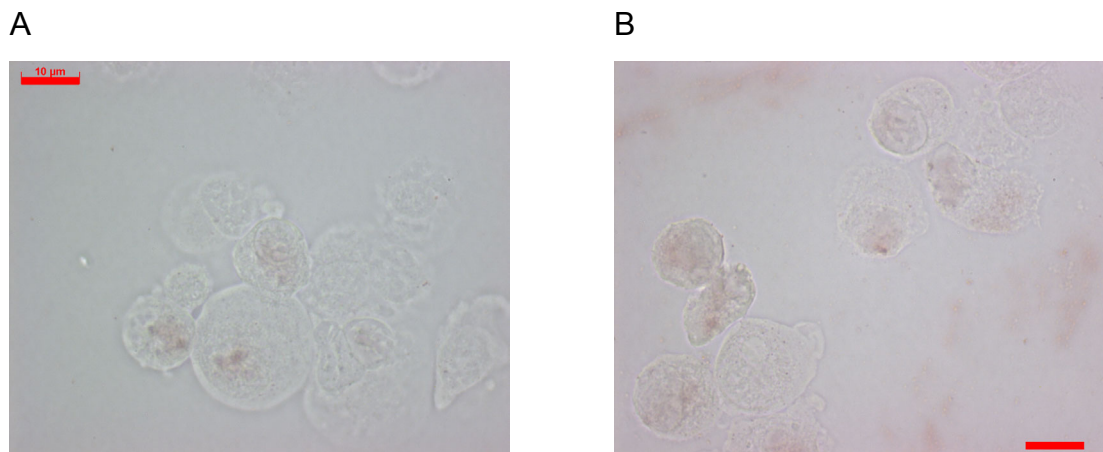


Abb. 3.40: MOG ist in G8.8⁺-mTEZ nicht nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von MOG in G8.8⁺-Zytospins. *A.* Die Sekundärantikörperkontrolle weist eine leichte Hintergrundreaktion auf, die vor allem die Kerne betrifft. *B.* Mit dem 8.18C5-Antikörper konnte kein Signal erzielt werden, das über die Hintergrundreaktion hinausgeht. Die leichte Hintergrundfärbung findet sich auch hier im Kern. Die Balken entsprechen 10 μm .

3.3.6.3 MOG ist nicht in tDC nachweisbar

MOG-mRNA ist, wie Insulin-mRNA, nicht in tDC gefunden worden. Auch das MOG-Protein konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.41).

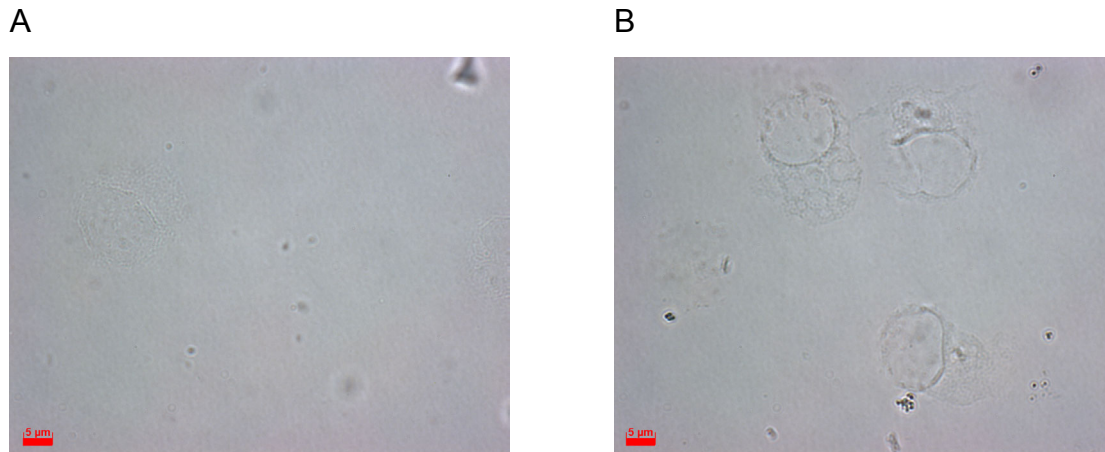


Abb. 3.41: MOG ist in tDC nicht nachweisbar. Immunhistologischer Nachweis von MOG auf N418⁺-tDC-Zytospins. A. Die Sekundärantikörperkontrolle ist negativ. B. Auch die komplette Färbung liefert kein Signal. Die Balken entsprechen 5 µm.

3.3.7 Zusammenfassung

Antigen	UEA ⁺ -mTEZ	G8.8 ⁺ -mTEZ	CDR1 ⁺ -kTEZ	tDC	Kontrollgewebe
Insulin	+	n.a.	n.a.	-	Pankreas
Somatostatin	+++	++	-	-	Pankreas
PLP	+++	++	+/-	-	Gehirn
MOG	n.a.	-	n.a.	-	Gehirn
S100β	+++	++	+	-	Gehirn
P1A	+++	++	-	-	Hoden

Tabelle 1: Die Expressionsmuster der untersuchten Antigene sind heterogen. UEA⁺-mTEZ weisen mehr stark exprimierende Zellen auf als G8.8⁺-mTEZ. Nur zwei untersuchte Antigene konnten in kTEZ gefunden werden. In tDC konnte keines der Antigene detektiert werden. Legende: +++ jede Zelle zumindest schwach positiv, >5% der Zellen stark positiv; ++ jede Zelle zumindest schwach positiv, <5% stark positiv; +/- positive Zellen vorhanden, aber auch Zellen vorhanden, in denen kein Signal detektiert werden konnte; - kein Signal detektiert; n.a. nicht analysierbar (Hintergrund, unspezifisches Signal)

3.4 Ko-Expression ektopisch exprimierter Proteine in UEA⁺-mTEZ

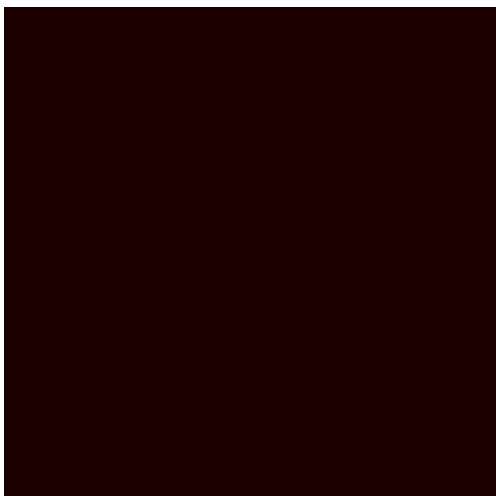
Bisher ist gezeigt, dass mTEZ ektopisch gewebespezifische Antigene exprimieren. Es stellte sich die Frage, ob die stärkere Expression Ausdruck eines regulatorischen Prozesses ist, der in den schwächer exprimierenden Zellen nicht abläuft. Letztere könnten stattdessen eine basale Transkriptionsrate besitzen, die über der anderer, nicht exprimierender Gewebe liegt. Um das zu testen, wurden Fluoreszenz-Doppelfärbungen etabliert. Da, abgesehen von den Seren und Antikörpern gegen Insulin, MOG und PLP, alle Antiseren aus Kaninchen stammen, können nur bestimmte Kombinationen verwendet werden. Kombinationen mit MOG sind aufgrund der Sortierung der Zellen mit MACS nicht möglich.

3.4.1 PLP und P1A werden ko-exprimiert

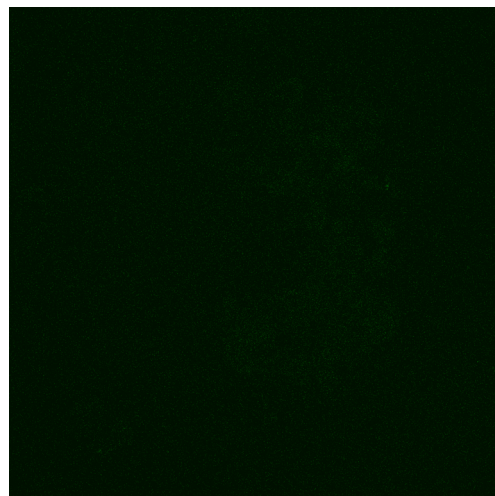
Die Kontrollen für diese Färbungen entsprechen denen der Einzelfärbungen, mit dem Unterschied, dass zusätzlich Kontrollen durchgeführt wurden, bei denen eine Einzelfärbung mit dem Zweitantikörper der anderen Färbung inkubiert wurde. Diese entsprachen generell der Kontrolle der Einzelfärbungen.

Hier zeigt sich, dass die vier sehr stark rot gefärbten Zellen, die PLP exprimieren, ebenfalls hoch P1A exprimieren, erkennbar an der gelben Mischfarbe (Abb. 3.42).

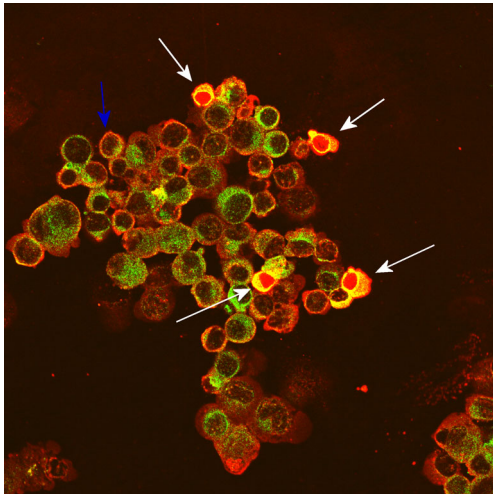
A



B



C



D

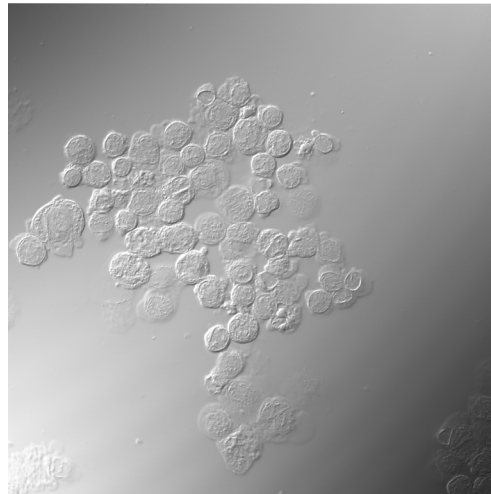
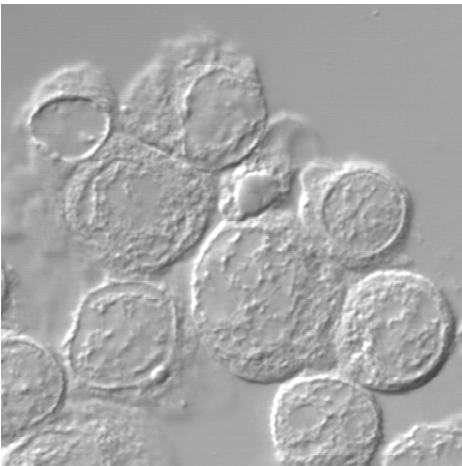
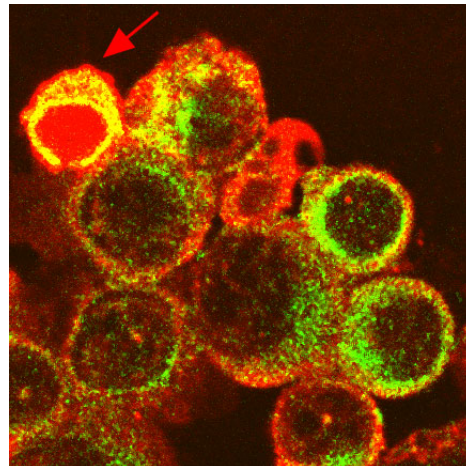


Abb. 3.42: PLP und P1A werden ko-exprimiert. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Cy3 (P1A, grün) und Cy5 (PLP, rot). Die Kontrollen wurden wie in den entsprechenden immunhistologischen Versuchen durchgeführt. *A.* Sekundärantikörperkontrolle für PLP. *B.* Kontrolle (Präimmunserum) für P1A. *C.* Ko-Expression von PLP und P1A erscheint gelb. Deutlich erkennbar ist, dass in vier der Zellen eine starke Ko-Expression vorliegt (weiße Pfeile), während in den übrigen Zellen die Expression beider Antigene heterogen ist. Meist liegen PLP und P1A schwach exprimiert zusammen in einer Zelle vor (blauer Pfeil). *D.* DIC-Darstellung von C. Die Ausschnitte entsprechen 200 μm .

A



B



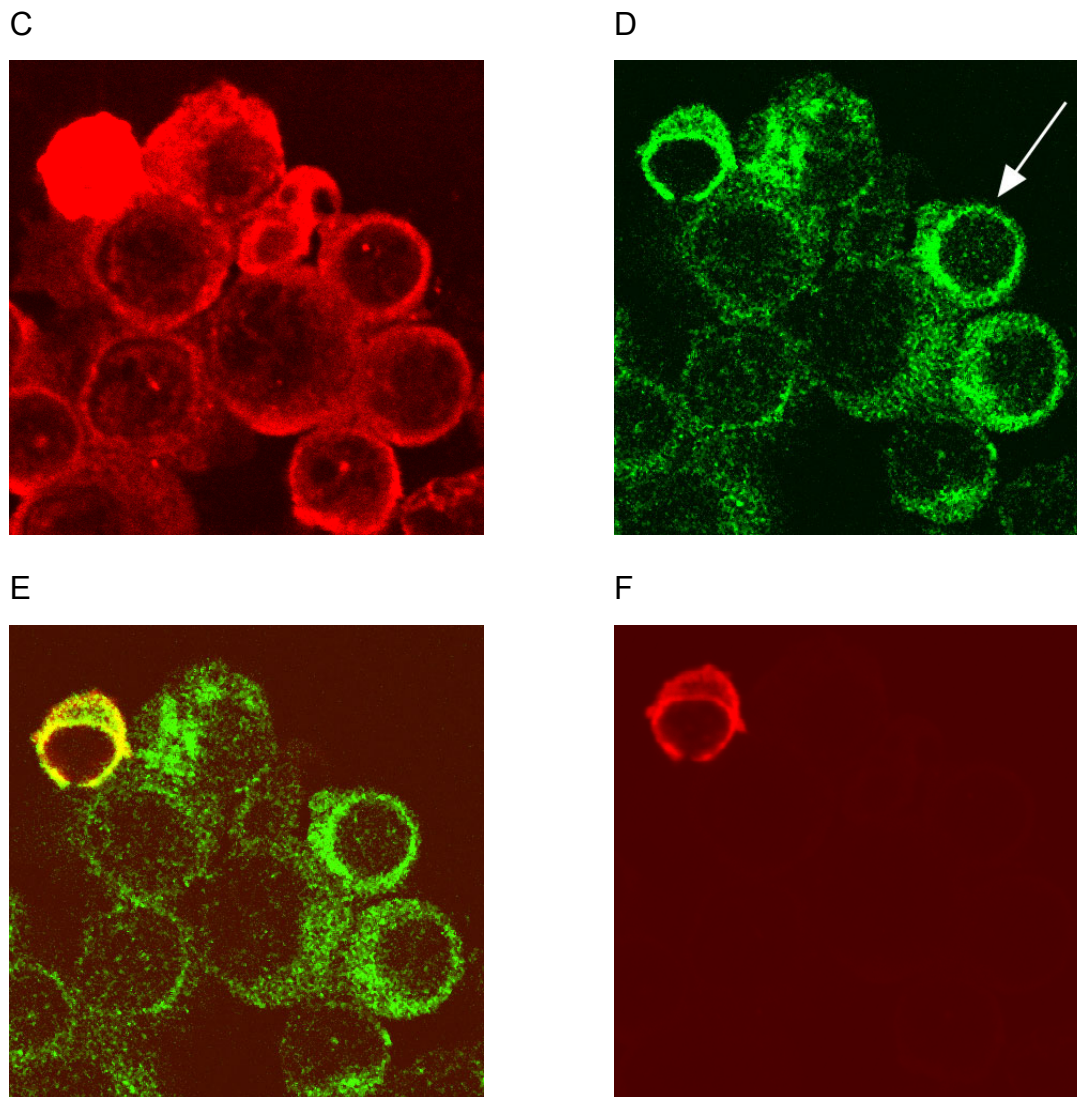


Abb. 3.43: Die Ko-Expression ist heterogen. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Cy3 (P1A, grün) und Cy5 (PLP, rot). Die Kontrollen wurden wie in den entsprechenden immunhistologischen Versuchen durchgeführt, Kontrollen siehe Abb. 3.42. Eine der vier stark ko-exprimierenden Zellen aus Abb. 3.42 ist vergrößert (roter Pfeil), es zeigt sich, dass sich PLP und P1A sehr stark anfärben lässt. *A.* DIC-Darstellung. *B.* Doppelfluoreszenz, die Überlagerung der Färbung für PLP und P1A zeigt sich in der gelben Färbung. *C.* Die ko-exprimierende Zelle ist sehr stark für PLP gefärbt. *D.* Die ko-exprimierende Zelle zeigt auch ein starkes Signal für P1A. Eine ähnlich stark P1A-exprimierende Zelle (weißer Pfeil) ist gleichzeitig nicht sehr stark für PLP positiv. Die übrigen Zellen exprimieren beide Antigene gleichzeitig auf einem mittleren Niveau. Die intrazelluläre Verteilung überlappt dabei nicht. *E* und *F.* *B* und *C* wurden mit kürzerer Belichtungszeit des Cy5-Kanals aufgenommen, wodurch sich die Intensität der PLP-Fluoreszenz reduzierte. Hier zeigt sich die subzelluläre Verteilung des PLP in der stark exprimierenden Zelle aus *B* und *C*. Die Ausschnitte entsprechen 50 μm .

Nicht alle Zellen, die P1A hoch exprimieren, sind auch stark für PLP gefärbt. Im Fall der mit dem weißen Pfeil markierten Zelle in Abb. 3.43 D ist eine starke Färbung für P1A zu erkennen, aber keine starke Färbung für PLP, wohingegen in den benachbarten, auf einem mittleren Niveau exprimierenden Zellen eine deutliche Anfärbung für beide Proteine zu finden ist. Die mei-

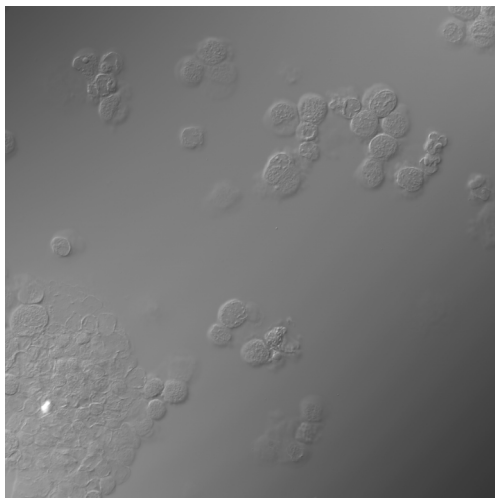
sten betrachteten Zellen dieser Präparation exprimieren beide Proteine auf einem niedrigen Niveau (Abb. 3.43). Wenige Zellen exprimieren beide Proteine sehr stark, und noch weniger Zellen exprimieren ein Protein stark, das andere jedoch schwach.

Hier wird die unterschiedliche subzelluläre Verteilung von PLP und P1A deutlich (Abb. 3.43). Die Färbungen für P1A und PLP überschneiden sich nicht vollständig, PLP wird vor allem in der Membran exprimiert und ist in geringerem Ausmaß auch in membranösen Strukturen im Zell-Innern zu finden. P1A ist ausschließlich in kleinen Vesikeln im Plasma lokalisiert. Entsprechend der subzellulären Verteilung überlappen sich die Färbungen nur partiell.

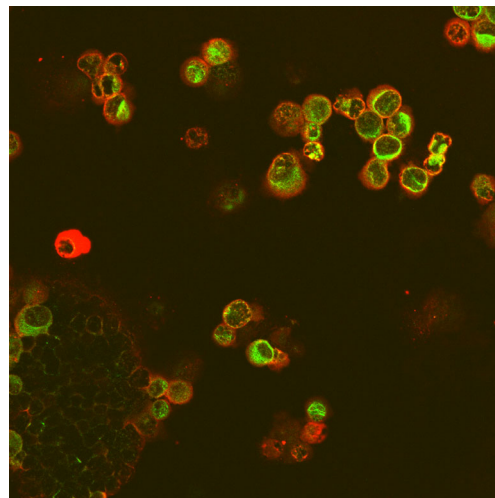
3.4.2 PLP und S100 β werden ko-exprimiert

Diese Färbung und die zugehörigen Kontrollen wurden wie oben beschrieben durchgeführt (nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass auch hier die Expression nicht überlappt (Abb. 3.44).

A



B



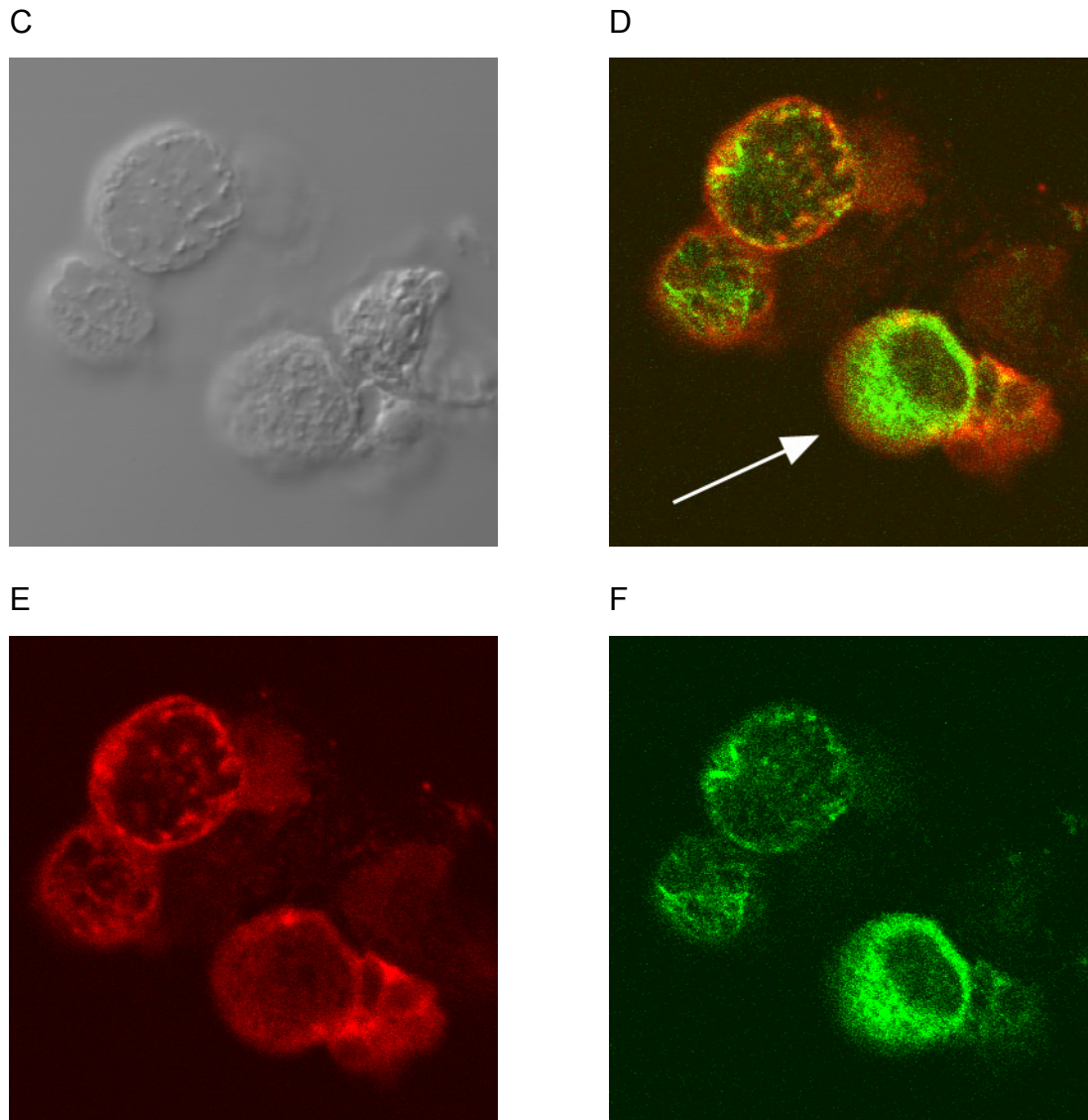


Abb. 3.44: S100 β und PLP werden ko-exprimiert. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Cy3 (S100 β , grün) und Cy5 (PLP, rot). Die Kontrollen wurden wie in den entsprechenden immunhistologischen Versuchen durchgeführt. Eine Zelle, die stark S100 β -positiv ist (Pfeil in D), exprimiert gleichzeitig nur niedrige Mengen an PLP. Die intrazelluläre Verteilung von PLP und S100 β überlappt nicht, S100 β befindet sich wie in den immunhistologischen Färbungen im Zytoplasma, während PLP in Membranen vertreten ist. Sämtliche Zellen ko-exprimieren PLP und S100 β zumindest auf niedrigem Niveau. Die Ausschnitte entsprechen 200 μ m in A und B, 50 μ m in C, D, E, F.

Beinahe alle Zellen ko-exprimieren PLP und S100 β auf niedrigem Niveau. Es gibt nur wenige Ausnahmen. Eine Zelle, die stark S100 β exprimiert, ist gleichzeitig nur sehr schwach für PLP gefärbt (Abb. 3.44 D, Pfeil). Eine andere Zelle exprimiert PLP sehr stark, ist aber zur gleichen Zeit für S100 β nur sehr schwach positiv (Abb. 3.45).

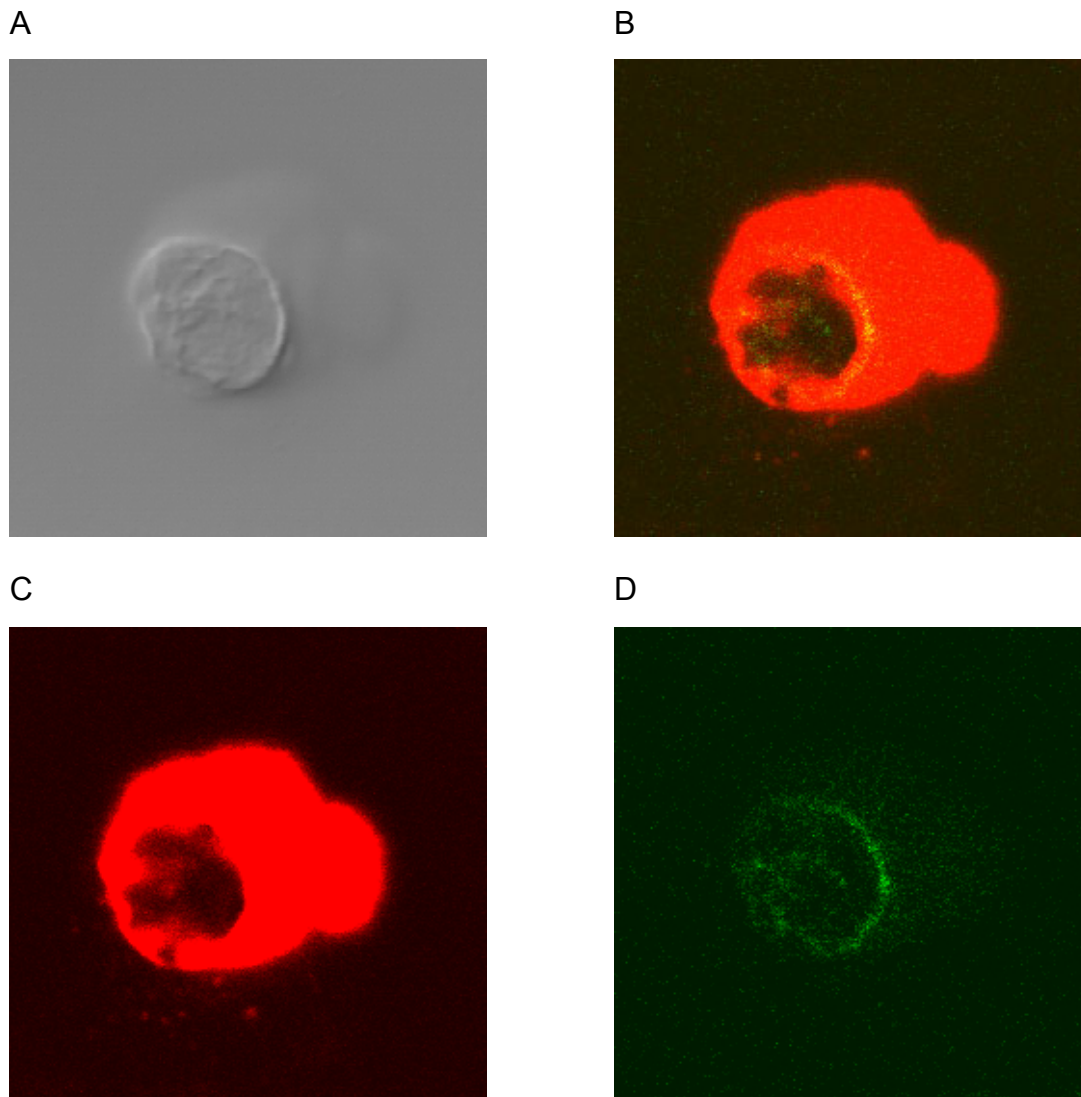


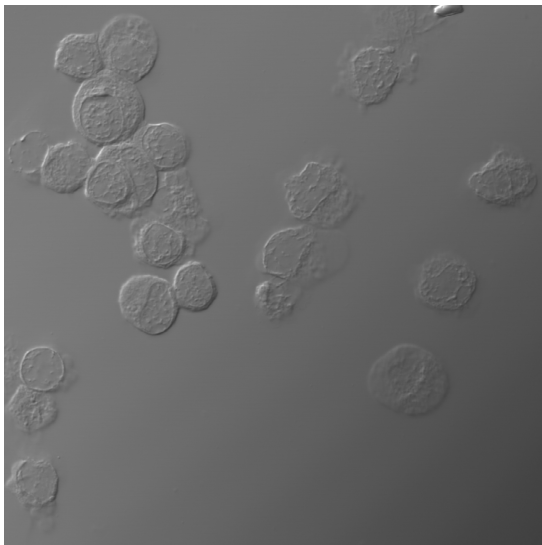
Abb. 3.45: Das Ko-Expressionsmuster für S100 β und PLP ist sehr heterogen. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Cy3 (S100 β , grün) und Cy5 (PLP, rot). Die Kontrollen wurden wie in den entsprechenden immunhistologischen Versuchen durchgeführt. Diese Zelle ist sehr stark positiv für PLP, jedoch nur schwach positiv für S100 β . Der Ausschnitt entspricht 20 μm .

Auch hier zeigt sich also, dass fast alle Zellen PLP und S100 β auf einem mittleren Niveau ko-exprimieren. Wenige Zellen exprimieren sehr stark, diese ko-exprimieren jedoch sehr selten beide Antigene stark. Auch hier überlappt das subzelluläre Expressionsmuster nicht, wie wegen der Überstrahlung der starken PLP-Färbung nur in schwächer angefärbten Zellen zu sehen ist (Abb. 3.44 D).

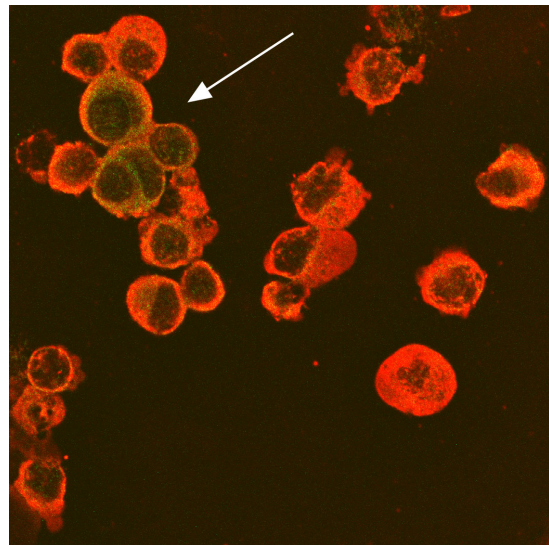
3.4.3 PLP und Somatostatin werden ko-exprimiert

Da stark exprimierende Zellen für Somatostatin selten sind, konnte nicht festgestellt werden, ob sie mit stark PLP exprimierenden Zellen korrelieren. Auch hier zeigte sich wieder, dass die intrazelluläre Lokalisation der beiden Proteine unterschiedlich ist, auch wenn sie sich in den Randbereichen der Zelle überschneidet. Somatostatin und PLP werden auf geringem Niveau ko-exprimiert.

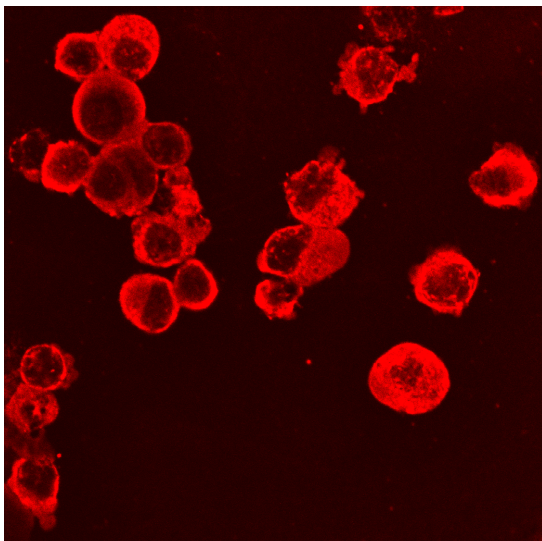
A



B



C



D

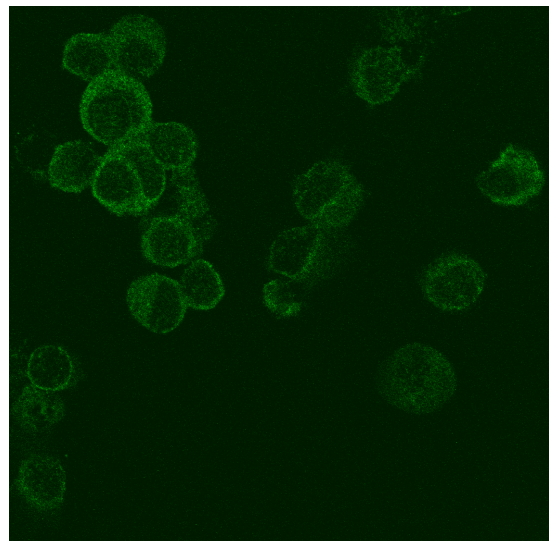


Abb. 3.46: Somatostatin und PLP werden ko-exprimiert. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Cy3 (Somatostatin, grün) und Cy5 (PLP, rot). Die Kontrollen wurden wie in den entsprechenden immunhistologischen Versuchen durchgeführt. *A.* DIC-Darstellung. *B.* Sämtliche Zellen exprimieren beide Antigene auf einem mittleren bis niedrigen Niveau. Ko-Expression auf einem hohen Niveau konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch exprimieren einige Zellen (Pfeil) beide Antigene deutlich. Die Ausschnitte entsprechen 250 µm.

3.4.4 Zusammenfassung

- Fast alle medullären Zellen exprimieren PLP, S100β, Somatostatin, Insulin und P1A auf niedrigem Niveau. MOG ist nicht nachzuweisen.
- Die Frequenz und die Intensität der Expression unterscheiden sich bei medullärem und kortikalem Epithel deutlich.
- Die subzelluläre Lokalisation der exprimierten Proteine unterscheidet sich nicht von der, die man auch im „Originalgewebe“ findet.
- Die schwächere Expression überlappt bei den drei getesteten Kombinationen (Somatostatin-PLP, S100β-PLP, P1A-PLP).
- Die sehr hohe Expression ist seltener (meist bei etwa 5% der Zellen) und ist bei Somatostatin nicht zu sehen.
- Es konnte häufig beobachtet werden, dass PLP und P1A von derselben Zelle gleichzeitig hoch exprimiert wurde, P1A wurde aber auch ohne die gleichzeitige starke Expression von PLP hoch exprimiert.
- Da sehr stark für Somatostatin angefärbte Zellen nicht gesehen wurden, konnte nicht beobachtet werden, dass Somatostatin und PLP in einer Zelle gleichzeitig hoch exprimiert waren.
- S100β und PLP werden selten in einer Zelle gleichzeitig hoch exprimiert.

3.5 Funktionelle Assays

Um herauszufinden, ob sich die Expression auf die Synthese beschränkt oder ob die Proteine auch auf der Oberfläche der medullären Epithelzellen präsentiert werden, wurden funktionelle Assays durchgeführt. Eine für das #11-Peptid (Sequenz siehe “Peptide” auf Seite 29) von PLP spezifische H2^b-restringierte CD4⁺-T-Zell-Linie wurde hergestellt. Diese Zellen wurden mit sortierten Epithelzellen aus Kortex und Medulla, peptidbeladenen und unbeladenen Milzzellen und sortierten Thymozyten stimuliert. Es zeigte sich, dass medulläre und kortikale Epithelzellen diese Linie stimulieren können, wohingegen die Thymozyten keine Reaktion hervorrufen (Abb. 3.47).

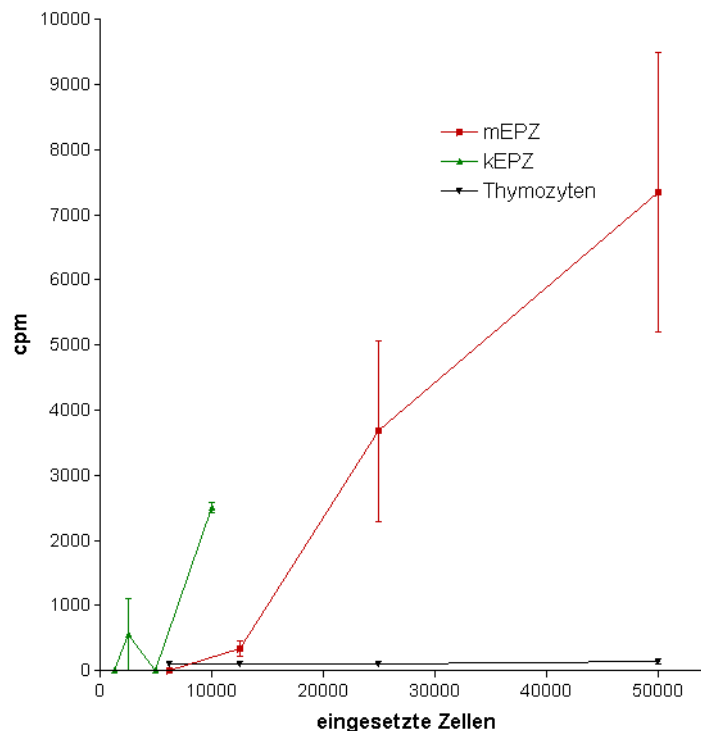


Abb. 3.47: mTEZ stimulieren CD4⁺-T-Zellen *in vitro*. mTEZ, kTEZ und Thymozyten wurden als APZs für eine PLP-spezifische CD4⁺-T-Zell-Linie verwendet.

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine weitere CD4⁺-T-Zell-Linien gegen das Peptid 139-151 in SJL-Mäusen hergestellt, die den Haplotyp H2^s aufweisen. Diese Linie erwies sich als Peptid-abhängig und spezifisch. Der Versuch wurde wie oben wiederholt, mit dem Unterschied, dass als Negativkontrolle mTEZ, kTEZ, Thymozyten und tDC aus Mäusen mit einem anderen Haplotyp (H2^b) verwendet wurden. Es zeigte sich, dass unbeladene mTEZ effektiv CD4-T-Zellen stimulieren können, wohingegen kTEZ und Thymozyten keine Reaktion hervorriefen. Peptidbeladene tDC (beladen mit 10µg/ml Peptid 139-151) stimulierten die T-Zellen effektiv, ebenso unbeladene tDC (Abb. 3.48).

Die Diskrepanz, dass im vorhergehenden Experiment kTEZ T-Zellen stimulieren können, in diesen Experiment die Proliferation der T-Zellen bei kTEZ nicht über der liegt, die mit kTEZ des falschen Haplotyps erzielt wird, ist dadurch zu erklären, dass im vorigen Experiment die T-Zellen auf die Anwesenheit der kTEZ allein reagierten, also unspezifisch proliferierten. Das

zweite Experiment zeigte, dass T-Zellen in Anwesenheit von kTEZ auch proliferieren, wenn diese den falschen Haplotyp aufweisen.

Die Experimente weisen darauf hin, dass PLP auf der Oberfläche der mTEZ präsentiert wird.

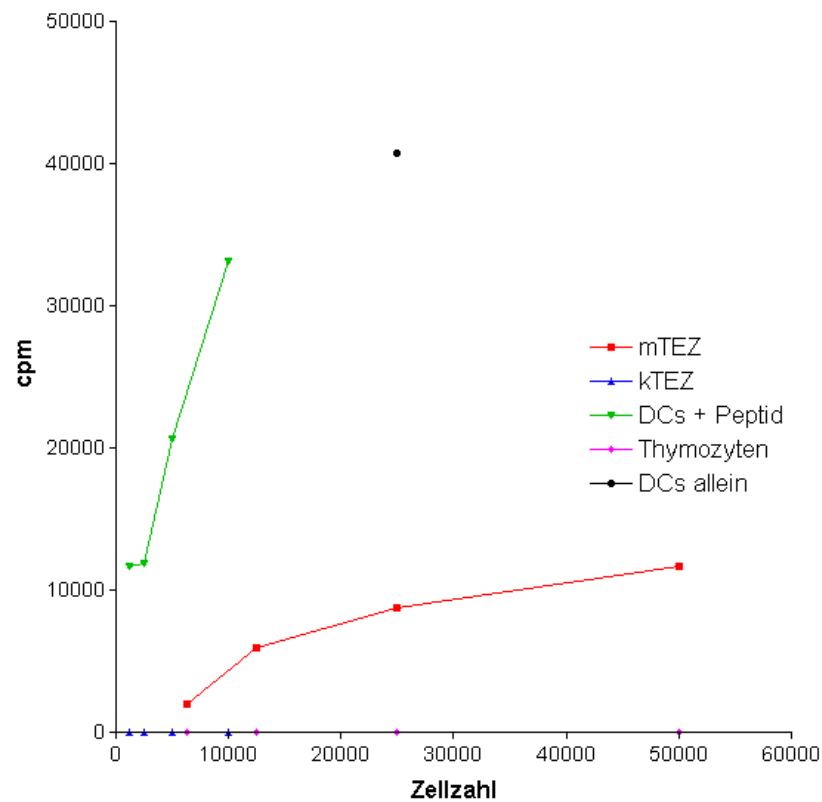


Abb. 3.48: mTEZ aus SJL-Tieren stimulieren eine PLP-spezifische CD4-T-Zell-Linie. Die Werte des Kontrollversuchs mit den entsprechenden Zellen mit dem falschen Haplotyp wurden abgezogen. Peptid-beladene DC stimulieren in geringer Zahl effektiv die Proliferation der T-Zellen. In größerer Zahl stimulieren sie auch unbeladen. Thymozyten und kTEZ können die T-Zellen nicht stimulieren.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionsmuster verschiedener „Gewebe-spezifischer“ Antigene auf Einzelzellebene zu untersuchen, zu vergleichen und zu bestimmen, ob es Ko-Expression der untersuchten Antigene in einzelnen mTEZ gibt. Bislang war bekannt, dass die untersuchten Antigene im Thymus transkribiert werden. Die Anzahl der Zellen, die diese Antigene exprimieren, konnte daraus jedoch nicht abgeleitet werden, ebenso wenig wie die Stärke der Expression in einer Zelle und die Frage, ob eine Zelle mehrere Antigene zugleich exprimieren kann. Diese Eigenschaften der ektopischen Expression sind von Bedeutung für die Mechanismen, die zur Induktion von zentraler Toleranz und zur ektopischen Expression führen.

Für diese Versuche wurden Thymuszell-Populationen isoliert und zu Zytospins verarbeitet bzw. im Proliferationsassay eingesät. Die Sortierung mittels MACS bzw. FACS führte zur Isolierung hochangereicherter Populationen. Die Kontamination durch andere Zellen lag bei 1% (FACS) bzw. 2-3% (MACS). Die FACS-Sortierung zeichnete sich durch höhere Reinheit der gewonnenen Populationen aus, hatte aber den Nachteil, dass die Zellen durch die langwierige Sortierung geschädigt wurden. Die MACS-Sortierung lieferte keine so hoch angereicherten Populationen und war nicht für die Aufarbeitung von kTEZ geeignet. Weil die Sortierung jedoch innerhalb von Minuten abgeschlossen werden konnte, war die Viabilität der Zellen höher als bei den FACS-sortierten Zellen. Die Ausbeute der MACS-Sortierung war außerdem generell höher als bei der FACS-Sortierung. Die MACS-Sortierung über die Bindung von UEA-1 an mTEZ wurde nicht die gesamte mTEZ-Fraktion isoliert, sondern es wurde eine Population angereichert, die vermutlich ein späteres Differenzierungsstadium der mTEZ darstellt. Die so isolierten mTEZ stellen eine Subpopulation der mittels des Antikörpers G8.8 isolierten mTEZ dar.

Um sich als Isolationsmethode für die Analyse der ektopischen Genexpression zu eignen, musste die Frequenz der kontaminierenden Zellen unterhalb der vermuteten ektopisch exprimierenden Zellen liegen. Untersuchungen an Gefrierschnitten von Thymi hatten gezeigt, dass die Frequenz der ektopisch exprimierenden Zellen sehr gering ist [58, 71, 72]. Die Versuche in dieser Arbeit zeigten, dass die stark exprimierenden mTEZ etwa 5% aller mTEZ ausmachten. Weil die Kontamination bei beiden Methoden unterhalb der Frequenz der stark exprimierenden Zellen lag, eigneten sich beide Methoden. Die Zellen konnten auf „Histobond“-Objektträger, auf denen Zellen besonders gut hafteten, aufgebracht werden, so dass die Anzahl der für jeden Ansatz verwendeten Zellen durch Auszählen leicht bestimmt werden konnte.

Von den beiden zur Detektion ektopisch exprimierender Zellen verwendeten Methoden war nur eine geeignet, Antigen auf Einzelzellebene nachzuweisen. Auf mRNA-Ebene konnten nur in Gefrierschnitten zwei Antigene nachgewiesen werden. Der Nachweis der anderen Antigene auf Gefrierschnitten scheiterte an Hintergrundreaktionen, die bei dem Nachweis geringer Mengen an mRNA aufgrund der notwendigen Verlängerung der Inkubationszeiten stark ansteigen. Für das Scheitern des Nachweises von mRNA in isolierten mTEZ auf Zytospins ist vermutlich die Isolationsprozedur verantwortlich. Da sie mehrere Stunden dauert und Schritte umfasst, die schädlich für die Zellen sind, ist es möglich, dass mTEZ die mRNA herunterreguliert haben und die vorhandene mRNA zerfallen ist. Obwohl sich die verwendeten Sonden als spezifisch für die zu detektierenden mRNAs gezeigt haben und sowohl die Fixierung der Zytospins als auch das verwendete ISH-Protokoll geeignet war, um mRNA in Kontrollzellen zu detektieren, eignete sich diese Methode nicht, um mRNA in isolierten mTEZ auf Einzelzellebene nachzuweisen.

Der Nachweis von Antigen als Protein in den isolierten mTEZ war demgegenüber möglich. Zwar war nur die Hälfte aller getesteten Antikörper zur Detektion von Antigen auf mTEZ geeignet, verursachte also keine unspezifischen Reaktionen und war spezifisch für das Zielantigen. Die übrigen Antikörper waren jedoch geeignet, um mit den meisten Thymus-Populationen kreuzreaktionsfreie und spezifische Färbungen hervorzubringen. Dass sich so wenige Antikörper zum Nachweis ektopisch exprimierter Gene in der Maus eigneten, lag daran, dass die verwendeten Antikörper zum Einsatz im Humansystem entwickelt worden waren. Zwar wurden nur solche Antikörper ausgesucht, deren Antigene eine homologe Entsprechung in der Maus hatten, doch das schloss unspezifische Reaktionen gegen andere Mausantigene oder die im FACS verwendeten Antikörper nicht aus.

Diese Nachweismethode lieferte Informationen darüber, in welchen und in wievielen Zellen das Antigen transkribiert wurde, und sie wies auch auf die subzelluläre Lokalisation und die Prozessierung des Antigens hin.

Im folgenden werden die Ergebnisse kurz zusammengefasst.

Nur Insulin und PLP konnten als mRNA-Transkripte in Thymus-Gefrierschnitten nachgewiesen werden, auf Einzelzellebene war kein Nachweis von mRNA möglich. Als Protein konnten PLP, Insulin, Somatostatin, S100 β und P1A in mTEZ auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Die ektopische Expression „Gewebe-spezifischer“ Antigene ist also eine Eigenschaft der mTEZ. MOG, ein weiteres ZNS-spezifisches Autoantigen, konnte nicht nachgewiesen werden. PLP und S100 β wurden auch in kTEZ translatiert, keines der untersuchten Antigene wurde je-

doch in tDC nachgewiesen. Die Expressionsmuster der untersuchten Antigene unterschieden sich: Während PLP, P1A, Somatostatin und S100 β deutliche Signale zeigten, erwies sich die Färbung für Insulin in mTEZ als wesentlich geringer als in B-Zellen des Pankreas. Auch innerhalb der untersuchten Populationen war das Expressionsmuster heterogen. Bei jedem untersuchten Antigen wurden wenige mTEZ (5-10%) stärker angefärbt, sämtliche mTEZ waren zumindest schwach positiv für PLP, P1A, Somatostatin, Insulin und S100 β . Das war nicht der Fall für kTEZ, wo im Fall von PLP und S100 β zwar Antigen in kTEZ nachgewiesen wurde, aber auch in vielen kTEZ kein Antigen detektierbar war.

Geringe Unterschiede in der Stärke der Expression und der Frequenz wurden für die UEA⁺-Subpopulation der mTEZ im Gegensatz zur Gesamtpopulation gefunden. Diese Unterschiede könnten auf einem höheren Reifestadium beruhen, der für UEA⁺-mTEZ diskutiert wird [110, 112]: Eventuell bilden UEA⁺-mTEZ eine Population, die am Ende ihrer Entwicklung steht, entdifferenziert und dadurch stark ektopisch exprimiert, ehe sie im Rahmen des „Turnovers“ der mTEZ zugrunde gehen. Da jedoch UEA⁺-mTEZ per MACS sortiert wurden, die G8.8⁺-Gesamtpopulation hingegen mit FACS-Sortierung, sind die Populationen nicht direkt vergleichbar. Unterschiede könnten auch mit der langwierigeren Sortierungsprozedur für die Gesamtpopulation zusammenhängen.

Subzellulär unterschied sich das gefundene Expressionsmuster nicht von dem, das in den Geweben zu finden ist, in denen das Antigen normalerweise exprimiert wird. Der Nachweis von PLP durch den O10-Antikörper zeigt, dass auch die posttranslationellen Modifikationen von mTEZ durchgeführt werden, da das O10-Epitop nur in korrekt gefaltetem und modifiziertem Protein erkannt wird. Quantitativ sind jedoch deutliche Unterschiede zu finden: Während PLP, P1A, S100 β und Somatostatin im Originalgewebe vergleichbar detektierbar sind wie in mTEZ und daher auch in ähnlichen Größenordnungen vorliegen dürften, ist Insulin in weitaus geringeren Mengen vorhanden; MOG ist gar nicht detektierbar, obwohl es in Gehirn-Gefrierschnitten unter denselben Bedingungen eindeutig nachweisbar ist und in der zusammengefassten G8.8⁺-mTEZ-Population per RT-PCR nachgewiesen werden konnte.

Ko-Expression in mTEZ konnte für P1A und PLP, Somatostatin und PLP und S100 β und PLP nachgewiesen werden. Auch das Ko-Expressionsmuster erwies sich als heterogen. Ko-Expression der untersuchten Antigene konnte auf niedrigem Niveau für jede Zelle nachgewiesen werden. mTEZ ko-exprimierten in manchen Fällen, jedoch nicht immer, zwei Antigene auf hohem Niveau. Starke Expression zweier Antigene in einer Zelle konnte für P1A und PLP gezeigt werden, weniger häufig für S100 β und PLP und mangels stark exprimierender Zellen nicht für So-

matostatin und PLP. Sowohl auf niedrigem als auch auf hohem Niveau konnte also Ko-Expression von Antigenen gezeigt werden, die nicht exklusiv einen Zelltyp definieren.

Auf funktioneller Ebene reagierten PLP-spezifische CD4⁺-T-Zellen stärker auf mTEZ als auf kTEZ oder Thymozyten. Dies könnte darauf hinweisen, dass PLP auf mTEZ funktionell präsentiert wird.

4.1 Die Heterogenität der Proteinexpression in mTEZ - Ursachen und Konsequenzen für die Induktion zentraler Toleranz

mRNA-Analysen geben keine Auskunft über die Verteilung ektopisch exprimierender mTEZ, sondern nur über die gemittelte Stärke der Transkription. Anhand der bereits vorhandenen Daten [69] war es möglich, dass manche mTEZ viel Antigen synthetisieren und andere gar nichts, oder dass sämtliche mTEZ auf einem niedrigen Niveau Antigen synthetisieren. Die Medulla des Thymus könnte ein Mosaik aus stark exprimierenden mTEZ sein, die für wenige Antigene „Inseln“ großer Antigendichte bilden, sie könnte aber auch ein Gemisch von Zellen sein, die auf niedrigem Niveau Antigene exprimieren. Die Verteilung der exprimierenden Zellen und deren Expressionsstärke hat Implikationen für die Frage, wie gewährleistet wird, dass Thymozyten möglichst viel Selbstantigen im Kontext von MHC auf mTEZ erkennen können. Zwei Modelle sind in der Diskussion: Das „serial scanning“-Modell postuliert, dass Thymozyten während ihres Aufenthalts in der Medulla möglichst viele Zellen „scannen“ und es von der Anzahl der Zell-Zell-Interaktionen abhängt, ob sie mit den exprimierten Antigenen in Kontakt kommen konnte. Das Modell des „antigen spreading“ geht davon aus, dass Antigen von wenigen Zellen gebildet und dann z.B. an tDC abgegeben wird, die einen „Hof“ aus Antigen um eine ektopisch präsentierende Zelle bilden und so die Chance des Thymozyten erhöhen, Zellen zu treffen, die ein bestimmtes Antigen präsentieren [109].

Die Versuche zeigen, dass die ektopische Expression der untersuchten Antigene in mTEZ heterogen ist. Alle mTEZ exprimieren die Antigene zumindest auf niedrigem Niveau, ein geringer Prozentsatz exprimiert sie auf hohem Niveau.

4.1.1 Ist die Expression der Autoantigene mit dem „normaler“ Antigene vergleichbar?

Für Autoimmunerkrankungen prädisponieren offenbar viele Faktoren, u.a. die Expression von Autoantigenen in der Medulla des Thymus. Bekannt ist, dass die Expression des Antigens in

mTEZ ausreichend ist, um Toleranz zu induzieren. Die bloße Anwesenheit des Antigens im Thymus reicht jedoch nicht aus, um Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Wesentlich für die Induktion von Toleranz ist, dass das Antigen in ausreichender Dichte auf mTEZ präsentiert wird, um Thymozyten negativ zu selektionieren. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Antigen auf MHC präsentiert wird, und damit die Antigendichte korreliert mit der Menge an synthetisiertem Antigen. Diese kann interindividuell variieren. Bei Mausstämmen sind solche Variationen zu beobachten, einerseits zwischen den Stämmen, da Mausstämme syngene sind, andererseits aber auch innerhalb der Stämme, da es auch Variationen gibt, die nicht komplett genetisch bedingt sind. Bei Analysen solcher interindividueller Variation an Maus- und Rattenstämmen und an Affen hat sich gezeigt, dass es eine Korrelation gibt zwischen der mRNA- und Protein-Menge für ein bestimmtes Antigen und der Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen [75, 76, 77, 113].

In dieser Arbeit wurden drei potentielle Autoantigene (PLP, MOG, Insulin) mit „normalen“ Antigenen (Somatostatin, P1A) verglichen. Tatsächlich zeigt sich dabei, dass zwei Autoantigene, MOG und Insulin, gar nicht bzw. nur sehr viel schwächer als im Originalgewebe nachweisbar sind, während die Farbreaktionen beim Nachweis von S100 β , Somatostatin und P1A sowohl in mTEZ als auch auf dem „Originalgewebe“ in der Sättigung lagen. Für MOG wurde aber ebenso wie für alle anderen Antigene mittels RT-PCR mRNA in mTEZ nachgewiesen [Jens Derbinski, persönliche Kommunikation]. MOG ist eventuell ein Grenzfall, ein Antigen, das zwar transkribiert, aber nicht stark genug translatiert wird, um Antigendichten auf mTEZ zu erreichen, die zur Toleranzinduktion ausreichend sind. Auch bei Insulin ist die Farbreaktion der Immunhistologie auf mTEZ erheblich schwächer als auf Pankreas-Schnitten. Dies deutet darauf hin, dass die Menge an Insulin in mTEZ deutlich unter der liegt, die im Pankreas zu finden ist. Es ist möglich, dass auch für Insulin die damit erreichten Antigendichten auf mTEZ gering sind. Für Insulin ist nachgewiesen worden, dass die interindividuelle Variation der Insulin-Expression im Thymus mit der Empfänglichkeit für Diabetes korreliert [75, 76]. Wie Egwuagu ausführt [113], ist die Induktion von Toleranz vermutlich keine Ja-Nein-Antwort, die von einem Schwellenwert abhängig ist, sondern die Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen sinkt, wenn die im Thymus exprimierte Proteinmenge steigt. Ein starker Stimulus (Injektion von Pertussis-Toxin oder Immunisierung von CFA) kann auch bei höheren Antigendichten zur Induktion von Autoimmunerkrankungen führen, während bei geringen Antigendichten bereits geringe Stimuli ausreichen können.

Anders liegt der Fall bei PLP. PLP wird in mTEZ hoch exprimiert, das Expressionsmuster ist dem von S100 β ähnlich. PLP zeigt jedoch im Gegensatz zu Insulin oder S100 β ein abweichendes Expressionsverhalten - außerhalb des ZNS wird vornehmlich die Variante DM20 exprimiert, der die Aminosäuren 139 bis 151 des PLP fehlen. Diese Sequenz taucht also im Thymus nur in geringen Mengen auf, so dass in empfänglichen Mausstämmen durch Immunisierung mit dem Peptid 139-151 EAE induziert werden kann. Hier führt also ein qualitativer Unterschied zu unvollkommener Toleranz.

Spleißvarianten können also die Induktion von Toleranz verhindern. Weitere Varianten sind zudem möglich: Glykosylierungsmuster, die im Thymus von denen im nichtlymphoiden Gewebe abweichen, können ebenso zum Auftreten von Epitopen führen, gegen die keine Toleranz erzeugt worden sind, wie „RNA editing“, das andere Peptidsequenzen und damit andere Epitope erzeugt.

4.1.2 Konsequenzen - ein zeitgesteuertes Modell des „serial scanning“?

Aus den gewonnenen Daten ist nicht direkt zu folgern, ob die schwache Expression in der Mehrzahl der mTEZ ausreicht, Toleranz zu induzieren, oder ob nur die stark exprimierenden mTEZ Toleranz vermitteln. Welche mTEZ Toleranz vermitteln, hängt davon ab, ob sie Antigen präsentieren und wenn ja, ob sie es in ausreichender Dichte präsentieren.

Sämtliche mTEZ exprimieren bis auf MOG alle untersuchten Antigene auf einem Niveau, das mit sensitiver Immunhistologie nachgewiesen werden kann. Die subzelluläre Verteilung der Antigene entspricht der der exprimierenden Zellen im Körpergewebe. In der Zelle synthetisiertes Protein kann prinzipiell auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Abweichende Antigenprozessierung ist z.B. nach INF- γ -Induktion des 20S-Proteasoms (Immunproteasom) bekannt [114]. Ob TEZ spezialisierte Proteasomen oder Proteasen wie das Immunproteasom exprimieren, ist unbekannt, wird allerdings für unwahrscheinlich gehalten, da das Immunproteasom vermutlich Selbstpeptide nur unzureichend prozessiert [115]. Bislang ist also nicht bekannt, ob sich die von mTEZ präsentierten Peptide qualitativ von denen unterscheiden, die von den Zellen des „Originalgewebes“ präsentiert werden. Wenn man davon ausgeht, dass die Antigenprozessierung in mTEZ genauso abläuft wie in somatischen Zellen, ist es wahrscheinlich, dass auch auf mTEZ endogenes „Gewebe-spezifisches“ Protein präsentiert wird.

Wesentlich zur Induktion von Toleranz ist die Quantität des Antigens: die Epitop-Dichte auf mTEZ. Schwach exprimierte Antigene konkurrieren mit anderen Antigenen um MHC-Moleküle. Die Epitop-Dichte kann sehr heterogen sein [111], sie hängt bei schwach exprimierten Antigenen u.a. davon ab, ob ausreichend MHC-Moleküle vorhanden sind, um eine solche Vielzahl von Antigenen zu präsentieren. Peptide hoch exprimierter Proteine wie die Produkte der „Hausaltsgene“ sind bei der Konkurrenz um MHC bevorzugt, weil sie häufiger und daher schon allein aus stochastischen Gründen bevorteilt sind, und belegen wahrscheinlich einen großen Teil der vorhandenen MHC-Moleküle. Konservative Schätzungen gehen von bis zu 5×10^5 MHC-Molekülen pro mTEZ aus [116] und davon, dass die Hälfte dieser MHCs von häufigen Peptiden besetzt sein könnte. Barton und Rudensky haben darauf aufbauend berechnet [116], dass eine antigenpräsentierende Zelle (APZ) zwischen 1000 und 100.000 seltene Peptide (10 bis 50 Kopien/Zelle) präsentieren könnte. Theoretisch reichen die MHC-Moleküle also aus, um auch seltene Peptide zu präsentieren. Die Anzahl der MHC-Antigen-Komplexe könnte damit für schwach exprimierte Antigene sehr gering sein. Stark exprimierte Antigene werden mit höherer Wahrscheinlichkeit auch präsentiert; dies sind bessere Bedingungen, um Toleranz zu induzieren, stark exprimierende mTEZ sind jedoch viel seltener.

Tatsächlich liegt die Schwelle, die zur Deletion von Thymozyten ausreicht, weit unter der, die zur Aktivierung von peripheren T-Zellen notwendig ist. Peterson und Unanue haben demonstriert, dass sehr wenige (weniger als 100, vermutlich bis zu drei) Peptid-MHC-Komplexe auf einer APZ ausreichen, um gegen dieses Peptid autoreaktive $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten zu deletieren [118, 120]. Sie argumentieren, dass durch diese Limitierung des Antigens vor allem hochaffine Thymoyzten deletiert werden können. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass vor allem hochaffine Thymozyten aus dem Repertoire entfernt werden, niedrigaffine, selbstreaktive Thymozyten aber in die Peripherie auswandern können.

Angenommen, ektopisch exprimierte Antigene werden präsentiert, so ist denkbar, dass auch die Expression in den schwach exprimierenden Zellen ausreicht, um Deletion hochaffiner Thymozyten zu induzieren. Durch die große Anzahl an Zellen, die Antigen schwach exprimieren, ist wahrscheinlich, dass ein Thymozyt bei der Interaktion mit einer Zelle potentiell sehr viele verschiedene und in geringer Zahl vorhandene Selbst-Peptid-MHC-Komplexe „scannen“ könnte. Die Wahrscheinlichkeit, Selbstantigen zu finden, an das ein autoreaktiver Thymozyt bindet, ist hoch, wenn jede Zelle geringe Mengen Autoantigen auf ihrer Oberfläche exprimiert. Es ist daher denkbar, dass die schwach exprimierenden mTEZ zur negativen Selektion zumindest beitragen.

Nicht nur Deletion wird in der Medulla induziert, die ektopische Expression ist auch für andere Mechanismen der Toleranzinduktion von Bedeutung. Die Deletion eliminiert zwar einen Großteil der Thymozyten, die die positive Selektion überstanden haben, jedoch betrifft sie nur die hochaffinen autoreaktiven Thymozyten. Die Anwesenheit niedrigaffiner selbstreaktiver T-Zellen in der Peripherie ist ein lange bekanntes Phänomen - auch in gesunden Organismen [119, 117]. Aufgrund der hohen Kreuzreaktivität der T-Zellen wird vermutet, dass die Eliminierung aller autoreaktiver Zellen zur Folge hätte, dass auch T-Zellen eliminiert werden, die Spezifitäten gegen Pathogene tragen, und dass somit potentielle Autoreaktivität hingenommen wird, um ein diverses, funktionelles T-Zell-Repertoire aufrecht zu erhalten [22]. Autoimmunerkrankungen, die durch diese niedrigaffinen T-Zellen ausgelöst werden könnten, werden, durch weitere Mechanismen verhindert, z.B. durch die Anergisierung der T-Zellen in der Peripherie, wenn diese außerhalb des Kontextes professioneller antigenpräsentierender Zellen auf ihr Antigen stoßen, oder durch die Sequestrierung des jeweiligen Gewebes. Zum Teil aber scheinen autoreaktive T-Zellen durch andere T-Zellen reguliert zu werden. Diese regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) werden im Thymus selbst erzeugt [22], sie regulieren autoreaktive T-Zellen in der Peripherie über einen unbekannten Mechanismus, der Zell-Zell-Kontakt erfordert [121, 122, 123]. In der Maus besitzen sie den Phänotyp $CD4^+CD25^+$ [124], und es ist gezeigt worden, dass die Eliminierung dieser Zellen Autoimmunerkrankungen induzieren kann. Im Gegensatz zur Eliminierung autoreaktiver Thymozyten ist dies ein aktiver, dominanter Toleranz-Mechanismus. Über die Generierung der T_{reg} ist bislang noch nicht viel bekannt. Es wird diskutiert, dass sie durch Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen induziert werden, vermutlich durch das Erkennen von Peptid-MHC-Komplexen, wobei potentiell der Kontakt mit einem Selbstpeptid ausreicht [125]. Sie sind offenbar hochaffin [126]. Geringe Antigen-MHC-Dichten, wie für schwach exprimierende mTEZ vermutet, könnten also auch zur Generierung dieser Zellen ausreichen und auch für diese Subpopulation die Wahrscheinlichkeit erhöhen, mit dem „passenden“ Antigen in Kontakt zu kommen.

Beruhend auf den Beobachtungen, könnte ein Modell zusammengefasst so aussehen: Thymozyten könnten während der 10 bis 14 Tage, die sie in der Medulla verbringen, an viele mTEZ binden, die Komplexe aus Selbst-MHCs und verschiedensten „Gewebe-spezifischen“ Peptiden präsentieren. Wenn jede mTEZ geringe Mengen „Gewebe-spezifisches“ Antigen exprimiert, ist das „Scannen“ möglichst vieler MHC-Selbstpeptid-Komplexe nur eine Frage der Zeit. Nimmt man an, dass die schwach exprimierenden mTEZ zur Induktion von Toleranz beitragen, erhö-

hen diese Zellen deutlich die Wahrscheinlichkeit, dass ein autoreaktiver Thymozyt oder eine potentielle regulatorische T-Zelle auf „passendes“ Antigen trifft.

4.1.3 Präsentieren mTEZ Antigen autonom?

Negative Selektion des T-Zell-Repertoires durch mTEZ setzt voraus, dass mTEZ Antigen funktionell präsentieren. Wie zuvor ausgeführt, ist wahrscheinlich, dass sie wie jede Körperzelle endogenes Antigen auf MHC-Klasse I präsentieren. Um allerdings sowohl $CD4^+$ - als auch $CD8^+$ -Thymozyten zu tolerisieren, müssten mTEZ sowohl auf MHC Klasse I- als auch auf MHC Klasse II-Molekülen „Gewebe-spezifisches“ Antigen präsentieren. mTEZ exprimieren beide MHC-Klassen und sind deshalb für die Tolerisierung beider Linien geeignet. Der typische Weg der Antigenpräsentation ist jedoch, dass zytosolisches Antigen auf MHC Klasse I präsentiert wird, während Klasse II-Moleküle Antigen präsentieren, das von Endosomen von außen in die Zelle gebracht wird. Gegen „Gewebe-spezifisches“ Antigen, das wie z.B. P1A zytosolisch ist, wären demnach nur $CD8^+$ -Thymozyten im Thymus tolerisierbar.

Untersuchungen haben gezeigt, dass es zu dieser Regel Ausnahmen gibt. Auch „endogenes“ Antigen kann auf MHC Klasse II-Molekülen exprimiert werden [127]. Für mTEZ selbst ist beschrieben, dass sie nukleäres Antigen funktionell auf Klasse II-Molekülen präsentieren können [128]. Ein Erklärungsversuch beruht darauf, dass Proteine, die die Zelloberfläche erreichen können (wie z.B. PLP als integrales Membranprotein) funktionell „exogen“ sind und damit auch über den klassischen endozytotischen Weg in die Zelle und auf MHC Klasse II-Moleküle gelangen können. Ein weiteres Modell postuliert, dass Proteine, die normalerweise im ER zurückgehalten werden, das ER verlassen und eventuell in Endosomen gelangen. Obwohl der Sortierungsweg unklar ist, besteht Einigkeit in dem Punkt, dass endogene Proteine auch auf MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden können. Es müsste für mTEZ gezeigt werden, ob dies zutrifft. Die bereits angesprochenen Untersuchungen von Peterson und Unanue, die gezeigt haben, dass die Expression von sehr wenigen Peptid-MHC-Komplexen auf einer APZ zur Deletion autoreaktiver Thymozyten führt [118, 120], unterstreichen jedoch die Möglichkeit, dass theoretisch sogar eine geringfügige, nichtklassische Präsentation auf MHC Klasse II zur Toleranzinduktion führen könnte.

Es ist also nachzuprüfen, ob mTEZ „Gewebe-spezifisches“ Antigen auf MHC Klasse I- und II-Molekülen präsentieren, die autonome Präsentation dieser Antigene also eine Eigenschaft der mTEZ ist. Doch wie groß ist ihre Rolle bei der Induktion zentraler Toleranz? Auch tDC sind an der Induktion zentraler Toleranz beteiligt. In welchem Ausmaß sich die beiden Zelltypen bei

dieser Aufgabe komplementieren und welchen Anteil mTEZ qualitativ und quantitativ an der Toleranzinduktion haben, ist bislang nicht klar. Dies hängt davon ab, wie das Selbst-Antigen-Repertoire gestaltet ist, das die beiden Zelltypen präsentieren. Präsentieren die beiden Zelltypen unterschiedliche Proteinsignaturen?

Antigen kann von Zellen auf verschiedene Arten akquiriert werden. Einerseits können sie es selbst produzieren - tDC und mTEZ präsentieren wie jede Körperzelle Proteine, die zum normalen Stoffwechsel der Zelle gehören, und zudem noch Antigene, die spezifisch für ihren Zelltyp sind. tDC synthetisieren und präsentieren Antigene, die typisch für die hämatopoetische Linie sind, mTEZ synthetisieren Epithelzell-spezifische Proteine. Diese Arbeit hat gezeigt, dass mTEZ zusätzlich „Gewebe-spezifische“ Antigene synthetisieren, tDC hingegen nicht. Die Proteinsynthese allein ist aber nicht entscheidend für die Frage, welches Repertoire eine Zelle präsentiert. Der Transfer von Antigen, etwa die Aufnahme von Antigen von anderen Zellen oder aus dem interstitiellen Raum, spielt bei APZs eine große Rolle und könnte auch bei der Toleranzinduktion eine entscheidende Rolle spielen. Transfer von Antigen wurde auch für mTEZ vermutet, etwa von mTEZ, die Antigen stark exprimieren, auf andere mTEZ, oder aus dem Interzellularraum.

Untersuchungen an Knochenmark-Chimären, die Antigen ausschließlich auf TEZ präsentieren können, weil die hämatopoetischen Zellen kein MHC Klasse II besitzen, haben jedoch gezeigt, dass mTEZ ausreichend sind, um Toleranz zu induzieren [60]. Das hämatopoetische System muss sich daran nicht beteiligen, ein Transfer von mTEZ oder aus der Peripherie auf tDC ist nicht notwendig. Dieses System schloss aber den Transfer von Antigen auf mTEZ nicht aus. Erst *in vivo*- und *in vitro*-Experimente an mTEZ und tDC, denen Antigen in großen Mengen angeboten wurde, zeigten, dass mTEZ Protein sehr schlecht endozytieren können [58] und damit auch nicht in der Lage sind, solches Antigen zu präsentieren. Nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen des Antigens sind mTEZ in der Lage, Antigen aufzunehmen und zu präsentieren. Das zeigt, dass der Transfer von Antigen von außen auf mTEZ oder zwischen mTEZ unwahrscheinlich ist. mTEZ präsentieren also unter physiologischen Bedingungen bevorzugt Antigene, die sie selbst synthetisieren. Teleologisch argumentiert, ist diese Eigenschaft der mTEZ sinnvoll, da sie verhindert, dass „wertvolle“, seltene Antigene (wie Insulin) durch häufige, „billige“ Antigene (wie Albumin) von außen verdünnt werden.

Diese Beobachtung schließt nicht aus, dass tDC auch „Gewebe-spezifische“ Antigene von mTEZ aufnehmen. Die Aufnahme von Antigen wäre, da sie die untersuchten Antigene nicht in nachweisbarer Menge selbst synthetisieren, die einzige Möglichkeit für tDC, sie zu präsentie-

ren. Lösliches Antigen wie Insulin, das von tDC aufgenommen werden könnte, wird wahrscheinlich auch von tDC präsentiert. Als potente „Scavenger“, die Antigen von sterbenden Zellen sowohl auf MHC Klasse I als auch MHC Klasse II präsentieren können („cross presentation“), könnten sie zudem Antigen von sterbenden mTEZ aufnehmen und präsentieren [129, 130]. „Gewebe-spezifische“ Antigene würden also auch das „hämatopoetische Selbst“ ergänzen und auf beiden MHC-Klassen sehr effektiv präsentiert werden können. Ein qualitativer Unterschied zwischen mTEZ und tDC besteht also darin, dass mTEZ ein spezialisiertes Selbstantigen-Repertoire präsentieren, tDC hingegen neben ihren Selbstantigenen auch Antigene der Umgebung präsentieren.

In diesem Zusammenhang sind die hoch exprimierenden mTEZ interessant, die ein späteres, vielleicht entdifferenziertes Stadium darstellen könnten und zugrunde gehen könnten, nachdem sie große Mengen Antigen ektopisch synthetisiert haben. Wenn diese Zellen von tDC aufgenommen werden und ihr Antigen präsentiert wird, würde dies eine besonders effektive Form des „Antigen spreading“ darstellen. Diese Überlegungen sind sehr spekulativ, da bislang noch nicht gezeigt werden konnte, dass die starke Expression in wenigen mTEZ mit einem anderen Differenzierungsstatus einhergeht.

Die angesprochenen Mechanismen schließen sich nicht aus, sondern könnten sich gegenseitig ergänzen und die Effektivität der Antigenpräsentation erhöhen. mTEZ könnten autonom ihr Antigen präsentieren - einmal klassisch auf MHC Klasse I, einmal über die unkonventionellen Wege auf MHC Klasse II, und dadurch einen „Pool“ epithelspezifischer und „Gewebe-spezifischer“ Antigene präsentieren. tDC repräsentieren das hämatopoetische Selbst, also die Antigene, die für hämatopoetische Zellen spezifisch sind, und zusätzlich lösliche Antigene und Antigene, die von sterbenden Zellen im Thymus (nicht notwendigerweise nur mTEZ) stammen. Der quantitative Anteil der mTEZ an der Toleranzinduktion ist demgegenüber nicht bekannt. Einen indirekten Anhaltspunkt liefern Versuche mit Knochenmark-Chimären, die zeigen, dass hämatopoetische Zellen mindestens 50% der Thymozyten, die die positive Selektion überstanden haben, deletieren können [131].

4.2 Welche molekularen Mechanismen liegen der ektopischen Expression in mTEZ zugrunde?

Ob und wie die ektopische Expression „Gewebe-spezifischer“ Antigene reguliert wird, ist bislang unklar. Durch Analyse einzelner Antigene kann diese Frage nicht bearbeitet werden. Deshalb wurden Ko-Expressionsanalysen durchgeführt.

Zwei Modelle wurden bisher für die ektopische Genexpression in mTEZ postuliert: 1. „Zelltyp-Mimikry“, mTEZ nehmen während ihrer Differenzierung die Eigenschaften einer somatischen Zelle an, z.B. die eines Oligodendrozyten, und exprimieren die Gene, die diesen charakterisieren. Diese Art der Genexpression wäre strikt reguliert. Im Versuch müsste man beobachten, dass eine mTEZ ausschließlich die Gene exprimiert, die für eine Körperzelle charakteristisch sind. 2. Die ektopische Expression beruht auf der zufälligen Expression von Antigenen aufgrund der Erhöhung der basalen Transkriptionsrate. Ein Hinweis dafür wäre, wenn eine mTEZ Antigene verschiedener somatischer Zellen exprimierte.

Durch Analyse der Ko-Expression konnte gezeigt werden, dass Antigene, die für verschiedene Zelltypen charakteristisch sind, in einer mTEZ exprimiert werden. Diese Beobachtung schließt bereits aus, dass die Expression „Gewebe-spezifischer“ Gene im Sinne des ersten Modells strikt reguliert ist. Die Ko-Expression fand auf zwei Ebenen statt: Einerseits wurden bis auf MOG alle untersuchten Antigene zumindest schwach in mTEZ ko-exprimiert. Dieser Befund ergibt sich bereits aus der Beobachtung, dass in allen mTEZ alle betrachteten Antigene bis auf MOG zumindest schwach nachgewiesen werden konnten und damit ko-exprimiert werden müssen. Andererseits konnten seltene Zellen gefunden werden, die P1A und PLP bzw. S100 β und PLP gemeinsam stark exprimieren. Ob derselbe Mechanismus für die starke Expression ebenso verantwortlich ist, wie für die schwache, ist nicht klar, ebensowenig, ob die starke Expression zeitlich und räumlich stabil ist oder fluktuiert. Möglich ist, dass die starke Expression auf einen „terminalen“ Differenzierungsschritt hinweist, der durch Entdifferenzierung und Überexpression ektopischen Antigens zum Tod der Zelle führt. Sicher ist, dass auf beiden Ebenen Ko-Expression stattfindet, daher kann für beide Ebenen „Zelltyp-Mimikry“ ausgeschlossen werden. Auffällig ist, dass bis auf MOG alle untersuchten Antigene ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufwiesen (ähnliche Frequenz, beide sowohl gering als auch stark exprimiert), obwohl sie in ihren „Originalgeweben“ unterschiedlich reguliert werden. Der Mechanismus, über den die ektopische Expression abläuft, muss also auf alle Genloci ähnlich wirken. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich dabei um einen übergeordneten Mechanismus handelt, also über einen,

der unabhängig von der Feinregulation der Gene ist, wie sie im „Originalgewebe“ vorkommt.

Es scheint jedoch unvereinbar mit der normalen Funktion einer Zelle, dass Gene „zufällig“ exprimiert werden. Die Expression von Antigenen, die nicht dem normalen Repertoire der Zelle entsprechen, und die Veränderung des Methylierungs- und Azetylierungsstatus von DNS bzw. Histonen charakterisiert häufig Krebszellen [80, 81, 82].

mTEZ sind aber nicht die einzigen Zellen des Organismus, die ein solches Verhalten an den Tag legen, ohne zu entarten: Auch Spermatozyten sind dafür bekannt, dass sie Antigene exprimieren, die für andere Organe spezifisch sind [132, 133, 134, 135], dies beeinträchtigt offenbar nicht ihre Funktion. Auch für Spermatozyten ist nicht bekannt, wie die ektopische Expression in diesen Zellen reguliert wird. Vermutet wird, dass die Transkriptionsmaschinerie und die Haltbarkeit der mRNA verändert werden, um mRNA für die letzten Schritte der Spermatogenese in translationell inaktiver Form abzulegen und wieder aktivieren zu können, wenn das Chromatin kondensiert und inaktiv ist. Für Komponenten des RNA-Polymerase II-Komplexes wie das TATA-bindende Protein (*tbp*) ist gezeigt worden, dass es vor allem in Spermatiden stark überexprimiert ist [132]. Auch auf Translationsebene sind in post-meiotischen Keimzellen Veränderungen gefunden worden, die zu einer erhöhten Proteinexpression führen könnten: Miyagi und Kuchino beispielsweise beschreiben die starke Überexpression eines Translations-Initiationsfaktors in post-meiotischen Keimzellen [136]. Andererseits ist immer noch nicht klar, ob die Expression z.B. ZNS-spezifischer Antigene oder Muskelantigene tatsächlich ektopisch, also außerhalb des physiologischen Kontext, geschieht, oder ob die Definition der Antigene zu eng gefasst wurde, diese Antigene also reguliert und physiologisch sinnvoll in Spermatozyten exprimiert werden und man ihre Funktion noch nicht kennt. Auch das wäre für einige Antigene im Thymus denkbar, z.B. für PLP, das als Protein außerhalb der mTEZ auch in kTEZ nachgewiesen wurde und dessen mRNA auf niedrigem Niveau auch in Makrophagen gefunden worden ist. Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, dass diese Erklärung für sämtliche in mTEZ gefundenen Antigene zutrifft.

Anhand der gewonnenen Resultate im Rahmen dieser Arbeit ist nicht zu klären, welcher Mechanismus für die ektopische Genexpression in mTEZ verantwortlich ist. Überexpression von Genen ist ein Phänomen, das auch von anderen Zelltypen bekannt ist. Es ist möglich, dass die Mechanismen, die bei Spermatozyten oder Krebszellen zur Überexpression von Antigenen führen, auch bei mTEZ vorhanden sind, namentlich Änderung des Methylierungs- oder Azetylie-

rungsstatus von DNS bzw. Histonen, Überexpression der RNS-Polymerase II-Komplexe und/oder der Transkriptions- oder Translationsfaktoren.

4.3 Ausblick

Für die Frage, ob mTEZ ihr Antigen auch autonom präsentieren, werden Versuche mit weiteren T-Zell-Linien unternommen. mTEZ müssten, wenn sie Antigen als Peptid-Selbst-MHC-Komplexe auf ihrer Oberfläche präsentieren, T-Zell-Linien stimulieren können, da sie im Gegensatz zu kTEZ über kostimulatorische Moleküle verfügen. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Linien sind geeignet, um die Frage zu klären, ob mTEZ auch intrazelluläre Antigene auf MHC Klasse II in ausreichender Dichte präsentieren können, um T-Zellen zu stimulieren. Dabei muss bedacht werden, dass die Peptid-MHC-Dichte, die T-Zellen zur Proliferation benötigen, weitaus größer sind als die, die Thymozyten zur Deletion bringen [118]. Erste Versuche dazu sind schon vorgenommen worden. Sie zeigten, dass CD4⁺-T-Zellen in Gegenwart von mTEZ, nicht aber in demselben Ausmaß von Thymozyten oder von mTEZ eines anderen Haplotyps stimuliert werden konnten. Diese Versuche wurden mit PLP-spezifischen Linien durchgeführt. PLP eignet sich für solche Versuche, da PLP^{-/-}-Mäuse existieren, deren mTEZ als Kontrolle dienen können. Weitere Versuche mit T-Zell-Linien, die für andere Antigene spezifisch sind, müssten diese Ergebnisse unterstützen. Dabei wäre es interessant, ein Antigen zu untersuchen, das im Gegensatz zu PLP nicht in die Membranen eingebaut wird, etwa ein nukleäres oder ein rein zytoplasmatisches Antigen. Gegen dieses Antigen könnten CD4⁺- und CD8⁺-Linien etabliert werden, mit denen geprüft werden könnte, ob mTEZ auf beiden MHC-Klassen zytosolisches oder nukleäres Antigen präsentieren.

Auf ähnliche Weise könnten Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, ob die schwach oder die stark exprimierenden mTEZ vornehmlich Toleranz induzieren. Man könnte die mTEZ durch Anfärbung und Sortierung per FACS in zwei Populationen aufteilen, in schwach und stark exprimierende mTEZ, und testen, ob die Präsentation auf den schwach exprimierenden mTEZ ausreicht, um eine spezifische T-Zell-Linie zu stimulieren. Möglich wäre auch, Aktivierungsversuche auf Einzelzellebene durchzuführen, wobei die Aktivierung der T-Zellen z.B. durch Visualisierung des Kalzium-Einstroms gemessen werden könnte. Diese Versuche sind aber nur dann aussagekräftig, wenn auch schwach exprimierende mTEZ T-Zell-Linien stimulieren können, denn Thymozyten werden bereits von viel geringeren Selbst-Peptid-MHC-Dichten deletiert, als zur Stimulation von T-Zell-Linien notwendig ist. Wenn schwach exprimierende mTEZ

im Experiment T-Zell-Linien stimulieren können, deutet dies darauf hin, dass sie auch Thymozyten negativ selektionieren können. Stimulieren sie die T-Zell-Linien nicht, schließt das nicht aus, dass sie Thymozyten negativ selektionieren können.

Vor allem zum Verständnis der ektopischen Genexpression auf molekularer Ebene sind weitere Experimente notwendig. Der Methylierungsstatus der mTEZ-DNS müsste bestimmt werden. Wenn sich zeigt, dass mTEZ-DNS auf Gesamtzelebene generell untermethyliert ist, deutet das darauf hin, dass der Methylierungsstatus für die ektopische Expression verantwortlich ist. Solche Experimente könnten an „gepoolten“ mTEZ durchgeführt werden. Aufschlussreicher aber wäre es, in mTEZ, die Antigene stark exprimieren, das stark exprimierte Antigen anzufärben und die Zellen im FACS zu sortieren, woraufhin der Methylierungsstatus einzelner Gene auf Einzelzelebene mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) bestimmt werden könnte.

Die differentielle Genanalyse mit DNS-Chips wäre ein geeignetes Mittel, um die Genexpression der mTEZ auf einer breiteren Basis zu untersuchen. Einerseits könnte damit das Repertoire der bekannten ektopisch exprimierten Gene erweitert werden, noch interessanter aber wäre eine Untersuchung bekannter Transkriptions- und Translationsfaktoren. Wenn diese Faktoren im Vergleich zu anderen epithelialen Geweben überexprimiert werden, ist möglicherweise eine unspezifische Erhöhung der Translations- oder Transkriptionsaktivität für die ektopische Expression verantwortlich.

In diesem Zusammenhang ist ein vermuteter Transkriptionsfaktor, der Autoimmune Regulator (AIRE), interessant, dessen Mutation zu einem autoimmunen Syndrom führt, das viele Organe betrifft. Von diesem Faktor wird angenommen, dass er an der Ausbildung des Thymus beteiligt ist [137], und es wäre von großem Interesse, welche Gene von diesem Transkriptionsfaktor direkt oder indirekt beeinflusst werden. Dies könnte anhand von AIRE^{-/-}-Mäusen untersucht werden, indem man die Genexpression im Thymus dieser Mäuse mit der in Thymi normaler Mäuse vergleicht.

Noch weit in der Zukunft liegt hingegen ein Ansatz, mit dessen Hilfe man die zeitliche Komponente der ektopischen Expression untersuchen könnte. Bisherige Untersuchungen sind Momentaufnahmen, die bestenfalls Aufschluss über den Status der Expression zum Zeitpunkt der Isolierung der Zellen geben. Ob die ektopische Expression in mTEZ zeitlich fluktuiert oder statisch ist, ist daher nicht bekannt. Es ist bereits gelungen, die Expression viraler Gene in lebenden Mäusen in Echtzeit zu verfolgen, indem das interessierende Gen mit Luziferase gekoppelt wurde und die Biolumineszenz *in vivo* mittels einer CCD-Kamera detektiert wurde [138]. In einem

anderen Experiment wurde *Salmonella typhimurum* mit Plasmiden transformiert, die ein Luciferase-Gen enthielten, wodurch die Wanderung der Bakterien im lebenden Tier untersucht werden konnte [139]. Der Nachweis der Biolumineszenz war auch in tiefer liegenden Geweben möglich. Prinzipiell wäre es denkbar, dass ähnlich manipulierte, ektopisch exprimierte Gene im Maus-Thymus auf diese Weise analysiert werden könnten. Um Artefakte durch die Bewegung des Tiers zu vermeiden und die Detektion zu erleichtern, könnten auch Thymus-Organkulturen verwendet werden, die über mehrere Tage hinweg beobachtet werden könnten. Dazu müsste die Methode eine Auflösung der Biolumineszenz auf Einzelzellebene ermöglichen, was bislang noch nicht möglich ist. Durch die Entwicklung empfindlicherer CCD-Kameras mit höherer Auflösung könnte dies jedoch in Zukunft möglich sein.

5 Zusammenfassung

Das Immunsystem ist für die Integrität des Organismus von entscheidender Bedeutung. Es vermittelt die Abwehr von Pathogenen und entarteten körpereigenen Zellen. T-Zellen als Teil der zellulären, adaptiven Immunantwort verfügen über eine Reihe von Mechanismen, mit denen sie die Immunreaktion steuern oder Zellen und Pathogene vernichten können. Es ist entscheidend, dass sich diese Mechanismen nicht gegen den eigenen Organismus richten: T-Zellen müssen selbsttolerant sein. Um dies zu erreichen, werden die T-Zell-Vorläufer in der Medulla des Thymus einem Selektionsprozess unterworfen, der negativen Selektion, den nur solche Thymozyten passieren können, die nicht oder nur mit niedriger Affinität an Selbst-Peptid-MHC-Komplexe auf mTEZ und hämatopoetischen Zellen binden. Dieser Prozess hat zur Folge, dass hochaffine selbstreaktive Thymozyten aus dem T-Zell-Repertoire eliminiert werden. Niedrigaffine selbstreaktive T-Zellen wandern in die Peripherie aus und bilden einen normalen Bestandteil des T-Zell-Repertoires. Sie werden offenbar von regulatorischen T-Zellen kontrolliert, die ebenfalls im Thymus durch Kontakt zu Selbst-Peptid-MHC-Komplexen generiert werden.

Um ein diverses Thymozyten-Repertoire zu selektionieren und um regulatorische T-Zellen zu erzeugen, müssen im Thymus sämtliche Selbst-Peptid-MHC-Komplexe vorhanden sein, die im Körper vorkommen können. Frühere Analysen haben ergeben, dass die Epithelzellen der Medulla selbst Antigene exprimieren, die man bislang als spezifisch für andere Organe betrachtet hatte, wie z.B. Insulin oder Antigene des ZNS. Auf Einzelzellebene war bislang jedoch wenig über das Expressionsmuster dieser Gene bekannt. Die Analyse des Expressionsmusters auf Einzelzellebene ist von Interesse, weil dadurch Aufschluss über die Regulation der ektopischen Expression gewonnen werden könnte. Zur Regulation der ektopischen Expression existierten zwei Modellvorstellungen: Das Modell des „Zelltyp-Mimikry“ postuliert, dass mTEZ durch einen Differenzierungsprozess die Eigenschaften einzelner Körperzellen annehmen und damit auch die Antigene exprimieren, die diese Körperzellen hervorbringen. Im Experiment dürften in individuellen mTEZ ausschließlich Antigene gefunden werden, die einem bestimmten somatischen Zelltyp entsprechen. Im Gegensatz dazu steht die Theorie, dass mTEZ „Gewebespezifische“ Antigene durch einen unbekannten, zufälligen Prozess exprimieren. Die experimentelle Voraussage war, dass eine mTEZ Antigene exprimiert, die spezifisch für unterschiedliche Zelltypen sind. Die Analyse der Frequenz der ektopisch exprimierenden mTEZ sollte darüberhinaus auch Hinweise auf das Modell des „serial scanning“ liefern. Bisherige Experimente hatten nahegelegt, dass nur wenige mTEZ ektopisch exprimieren. Dadurch stellte sich

die Frage, wie wenige mTEZ ein komplettes Repertoire tolerisieren können.

Durch *in situ*-Hybridisierung und immunhistologische Methoden wurde daher das Expressionsmuster der „Gewebe-spezifischen“ Gene bestimmt. ISH war nicht geeignet, um mRNA auf Einzelzellebene in sortierten mTEZ nachzuweisen, aber mittels Immunhistologie und Immunfluoreszenz konnten mehrere Antigene auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass alle mTEZ zumindest schwach positiv für Insulin, Somatostatin, PLP, S100 β und P1A waren. Zusätzlich waren etwa 5% der mTEZ stark positiv für diese Antigene. In kTEZ konnte nur PLP und S100 β nachgewiesen werden. MOG konnte in mTEZ nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte keines der Antigene in tDCs nachgewiesen werden.

Durch Doppelfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass alle mTEZ die untersuchten Antigene zumindest schwach ko-exprimieren. Einige mTEZ ko-exprimieren zudem die untersuchten Antigene stark. mTEZ exprimieren also „Gewebe-spezifische“ Antigene, die nicht spezifisch für einen Zelltyp sind, so dass „Zelltyp-Mimikry“ ausgeschlossen werden kann. Welcher Mechanismus stattdessen für die ektopische Expression verantwortlich ist, konnte nicht geklärt werden. Da die untersuchten Antigene in mTEZ in sehr ähnlichen Frequenzen exprimiert werden, obwohl sie in ihren „Originalgeweben“ unterschiedlich reguliert werden, ist ein übergeordneter Mechanismus wie die Änderung des Methylierungsstatus oder des Azetylierungsstatus denkbar, ebenso die Überexpression von Komponenten der Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Zelle. Solche Mechanismen sind bereits für Spermatozyten und Krebszellen bekannt.

Auf subzellulärer Ebene unterscheidet sich das Expressionsmuster der Antigene nicht von dem im „Originalgewebe“, auch posttranslationale Modifikationen wie am Beispiel des PLP wurden durchgeführt. Betrachtungen anderer Gruppen zeigen, dass die so exprimierten Antigene im Prinzip von mTEZ auch funktionell auf beiden MHC-Klassen präsentiert werden könnten und dass diese Präsentation zur Induktion von regulatorischen T-Zellen und für die Deletion ausreichen könnte. Im Gegensatz zur bisherigen Sichtweise, dass nur wenige mTEZ ektopisch exprimieren und an der Toleranzinduktion beteiligt sind, ist daher denkbar, dass auch mTEZ, die ein Antigen schwach exprimieren, an der Induktion von Toleranz beteiligt sein könnten. Ihr Beitrag erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass autoreaktive Thymozyten während ihres Aufenthalts in der Medulla relevante Selbst-Antigen-Peptid-Komplexe erkennen. „Antigen spreading“ z.B. auf tDCs wäre somit nicht notwendig. Dies wird gestützt durch frühere Beobachtungen, die besagen, dass die Beteiligung von hämatopoetischen Zellen für die Induktion von Toleranz nicht notwendig ist. Zudem können mTEZ unter physiologischen Bedingungen nur schlecht endozy-

tieren, so dass sie sich zur Aufnahme und Präsentation exogenen Antigens nicht gut eignen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass mTEZ „Gewebe-spezifisches“ Antigen autonom präsentieren. Somit präsentieren mTEZ ein spezialisiertes Peptid-Repertoire: Neben den Haushaltsantigenen und Antigenen, die für Epithelzellen spezifisch sind, präsentieren sie „Gewebe-spezifische“ Antigene. Dieses Repertoire ergänzt das der tDCs, die neben den Haushaltsantigenen und den Antigenen, die spezifisch für die hämatopoetische Linie sind, auch exogenes Antigen aufnehmen, also Antigen, das sie aus dem interstitiellen Raum und von sterbenden Zellen aufgenommen haben.

6 Literatur

- 1 Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE (1993) Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 14(10):483-6
- 2 Katlama C, Dickinson GM (1993) Update on opportunistic infections. *AIDS* 7 Suppl 1:S185-94
- 3 Milliken S, Boyle MJ (1993) Update on HIV and neoplastic disease. *AIDS*. 7 Suppl 1:203-9
- 4 Khanna KV, Markham RB (1999) A perspective on cellular immunity in the elderly. *Clin Infect Dis*. 1999 Apr;28(4):710-3
- 5 Wick G, Grubeck-Loebenstein B (1997) The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. *Exp Gerontol*. 32(4-5):401-13
- 6 Hafler DA, Weiner HL (1995) Immunologic mechanisms and therapy in multiple sclerosis. *Immunol Rev*. 144:75-107
- 7 Hirokawa K, Utsuyama M, Kobayashi S (2001) Hypothalamic control of thymic function. *Cell Mol Biol*;47(1):97-102
- 8 Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G (2001) Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol*. 22(3):147-84
- 9 Pollmacher T, Haack M, Schuld A, Kraus T, Hinze-Selch D (2000) Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. *J Psychiatr Res*. 34(6):369-82
- 10 Sternberg EM (2001) Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol*. 169(3):429-35
- 11 Carroll MC, Fischer MB (1997) Complement and the immune response. *Curr Opin Immunol*. 9(1):64-9
- 12 Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ (2001) The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci*. 58(7):978-89
- 13 Fellermann K, Stange EF (2001) Defensins -- innate immunity at the epithelial frontier. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 13(7):771-6
- 14 Schroder JM (1999) Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci*. 1;56(1-2):32-46
- 15 Müller-Eberhard HJ (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*. 57:321-47
- 16 Weiss A, Littman DR (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76(2):263-74
- 17 Paul WE (1999) *Fundamental Immunology*, Lippincott Williams & Wilkins
- 18 Chien YH, Gascoigne NR, Kavaler J, Lee NE, Davis MM (1984) Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* 24-30;309(5966):322-6
- 19 Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC (1996) Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 14;384(6605):134-41.

- 20 Zinkernagel RM, Doherty PC (1997) The discovery of MHC restriction. *Immunol Today*. 18(1):14-7
- 21 Mosmann TR, Sad S (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17(3):138-46
- 22 Seddon B, Mason D (2000) The third function of the thymus. *Immunol Today*. 21(2):95-9
- 23 Modigliani Y, Coutinho A, Pereira P, Le Douarin N, Thomas-Vaslin V, Burlen-Defranoux O, Salaun J, Bandeira A (1996) Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. *Eur J Immunol*. 26(8):1807-15
- 24 Modigliani Y, Pereira P, Thomas-Vaslin V, Salaun J, Burlen-Defranoux O, Coutinho A, Le Douarin N, Bandeira A (1995). Regulatory T cells in thymic epithelium-induced tolerance. I. Suppression of mature peripheral non-tolerant T cells. *Eur J Immunol*. 25(9):2563-71.
- 25 Le Douarin N, Corbel C, Bandeira A, Thomas-Vaslin V, Modigliani Y, Coutinho A, Salaun J (1996) Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells. *Immunol Rev*. 149:35-53.
- 26 Manley NR (2000) Thymus organogenesis and molecular mechanisms of epithelial cell differentiation. *Semin Immunol* 12: 421-428
- 27 Anderson G, Jenkinson EJ, Moore NC, Owen JJ (1993) MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *J. Exp. Med*. 191: 1051-1056
- 28 Le Douarin NM, Dieterlen-Lievre F, Oliver PD (1984) Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am J Anat* 170:261-299
- 29 Naquet P, Naspetsi M, Boyd R (1999) Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin Immunol* 11:47-55
- 30 van Ewijk W, Holländer G, Terhorst C, Wang, B (2000) Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* 127: 1583-1591
- 31 Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, Bean AG, Ladyman HM, Ritter MA, Hugo P (1998) The thymic microenvironment. *Immunol Today* 14:445-459
- 32 van Ewijk W, Wang B, Hollander G, Kawamoto H, Spanopoulou E, Itoi M, Amagai T, Jiang YF, Germeraad WT, Chen WF, Katsura Y. (1999) Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin Immunol*. 1999 Feb;11(1):57-64
- 33 Savin W, Dalmau SR, Dealmeida VC (2000) Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol* 2000;7(2-4):279-91
- 34 Van Vliet E, Jenkinson EJ, Kingston R, Owen JJ, Van Ewijk W (1985) Stromal cell types in the developing thymus of the normal and nude mouse embryo. *Eur J Immunol* Jul;15(7):675-81
- 35 Van Vliet E, Melis M, Van Ewijk W (1984) Monoclonal antibodies to stromal cell types of the mouse thymus. *Eur J Immunol* 14(6):524-9
- 36 Small M, Van Ewijk W, Gown AM, Rouse RV (1989) Identification of subpopulations of mouse thymic epithelial cells in culture. *Immunology* 68(3):371-7
- 37 Farr A, Nelson A, Truex J, Hosier S (1991) Epithelial heterogeneity in the murine thymus: a cell surface glycoprotein expressed by subcapsular and medullary epithelium. *J Histo-*

- chem Cytochem 39(5):645-53
- 38 Rouse RV, Bolin LM, Bender JR, Kyewski BA (1988) Monoclonal antibodies reactive with subsets of mouse and human thymic epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 36(12):1511-7
 - 39 Farr AG and Anderson SK (1985) Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells *J Immunol* 134: 2971-2977
 - 40 Shortman KD (1992) Cellular aspects of early T-cell-development. *Curr Opin Immunol* 4: 140-146
 - 41 Prockop S, Petrie HT (2000) Cell migration and the anatomic control of thymocyte precursor differentiation. *Semin Immunol.* 12(5): 435-44
 - 42 Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT (2001) Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med.* 16;194(2): 127-34
 - 43 Groettrup M, von Boehmer, H (1993) A role for a pre-T-cell receptor in T cell development *Immunol Today* 14. 610-614
 - 44 Jameson SC, Bevan MJ (1998) T-cell selection. *Curr Opin Immunol* 10:214-219
 - 45 Hogquist KA, Bevan MJ (1996) The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection. *Semin Immunol.* 8(2): 63-8
 - 46 Hogquist KA, Gavin MA, Bevan MJ (1993) Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med.* 1;177(5): 1469-73
 - 47 Barton GM, Rudensky AY (1999) Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. *Science* 1;283(5398):67-70
 - 48 Sant'Angelo DB, Waterbury PG, Cohen BE, Martin WD, Van Kaer L, Hayday AC, Janeway CA Jr (1997) The imprint of intrathymic self-peptides on the mature T cell receptor repertoire. *Immunity* 7(4): 517-24
 - 49 Merkenschlager M (1996) Tracing interactions of thymocytes with individual stromal cell partners. *Eur J Immunol.* 26(4): 892-6
 - 50 Goodnow CC, Adelstein S, Basten A (1990) The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* 15;248(4961):1373-9
 - 51 von Boehmer H, Kiesilow P (1990) Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science* 248:1369-1373
 - 52 Nossal GJV (1994) Negative selection of thymocytes. *Cell* 76:229-239
 - 53 Goodnow CC (1996) Balancing immunity and tolerance: Deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Nat Acad Sci USA* 93:2264-2271
 - 54 Klein L, Kyewski B (2000) Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol.* 2(2):179-86
 - 55 Stockinger B (1999) T lymphocyte tolerance: From thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv Immunol* 71:229-265
 - 56 Kappler JW, Roehm N, Marrack P (1987) T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49:273-280
 - 57 Hoffmann MW, Allison J, Miller JFAP (1992) Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Sci USA* 89:2526-2530

- 58 Klein L, Roettinger B, Kyewski B (2001) Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance. *Eur J Immunol.* 31(8):2476-86.
- 59 Bell D, Young JW, Banchereau J (1999) Dendritic cells. *Adv Immunol.* 72:255-324
- 60 van Meerwijk JP, MacDonald HR (1999) In vivo T-lymphocyte tolerance in the absence of thymic clonal deletion mediated by hematopoietic cells. *Blood* 1;93(11): 3856-62
- 61 Laufer TM, Fan L, Glimcher LH. (1999) Self-reactive T cells selected on thymic cortical epithelium are polyclonal and are pathogenic in vivo. *J Immunol.* 1;162(9): 5078-84
- 62 Mariathasan S, Jones RG, Ohashi PS (1999) Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin Immunol.* 11(4):263-72
- 63 Surh CD, Gao EK, Kosaka H, Lo D, Ahn C, Murphy DB, Karlsson L, Peterson P, Sprent J (1992) Two subsets of epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med* 1;176(2):495-505
- 64 Mariathasan S, Ho SS, Zakarian A, Ohashi PS (2000) Degree of ERK activation influences both positive and negative thymocyte selection. *Eur J Immunol* 30(4):1060-8
- 65 Stefanski HE, Mayerova D, Jameson SC, Hogquist KA (2001) A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 1;166(11):6602-7
- 66 Utting O, Teh SJ, Teh HS (1998) T cells expressing receptors of different affinity for antigen ligands reveal a unique role for p59fyn in T cell development and optimal stimulation of T cells by antigen. *J Immunol* 1;160(11):5410-9
- 67 Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B (2000) Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med.* 6(1):56-61
- 68 Doffinger R, Klein TC, Pepys MB, Casanova JL, Kyewski BA (1997) The MHC class II-restricted T cell response of C57BL/6 mice to human C-reactive protein: homology to self and the selection of T cell epitopes and T cell receptors. *Mol Immunol.* 34(2): 115-24
- 69 Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* 2(11):1032-9.
- 70 Hanahan D (1998) Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 10(6):656-62
- 71 Smith KM, Olson DC, Hirose R, Hanahan D (1997) Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol.* 9(9):1355-65
- 72 Kojima K, Reindl M, Lassmann H, Wekerle H, Linington C (1997) The thymus and self-tolerance: co-existence of encephalitogenic S100 beta-specific T cells and their nominal autoantigen in the normal adult rat thymus. *Int Immunol.* 9(6):897-904
- 73 Klein L, Klein T, Ruther U, Kyewski B (1998) CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J Exp Med.* 6;188(1):5-16.
- 74 Klein TC, Doffinger R, Pepys MB, Ruther U, Kyewski B (1995) Tolerance and immunity to the inducible self antigen C-reactive protein in transgenic mice. *Eur J Immunol.* 25(12): 3489-95.
- 75 Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2

- susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet.* 15(3): 293-7.
- 76 Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* 15(3): 289-92
 - 77 Liu H, MacKenzie-Graham AJ, Kim S, Voskuhl RR (2001) Mice resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis have increased thymic expression of myelin basic protein and increased MBP specific T cell tolerance. *J Neuroimmunol* 2;115(1-2):118-26
 - 78 Robertson KD (2001) DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20(24):3139-55
 - 79 Robertson KD, Jones PA (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 21(3):461-7
 - 80 Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 21(2):163-7
 - 81 Bestor TH, Tycko B (1996) Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet.* 12(4):363-7
 - 82 Leonhardt H, Cardoso MC (2000) DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer *J Cell Biochem Suppl* 35:78-83
 - 83 Du Y, Carling T, Fang W, Piao Z, Sheu JC, Huang S (2001) Hypermethylation in Human Cancers of the RIZ1 Tumor Suppressor Gene, a Member of a Histone/Protein Methyltransferase Superfamily. *Cancer Res* 15;61(22):8094-9.
 - 84 Wong IH (2001) Methylation profiling of human cancers in blood: Molecular monitoring and prognostication *Int J Oncol.* 19(6):1319-24.
 - 85 Fang JY, Xiao SD (2001) Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 16(9):960-8.
 - 86 Szyf M, Detich N (2001) Regulation of the DNA methylation machinery and its role in cellular transformation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 69:47-79
 - 87 Jiang H, Shah S, Hilt DC (1993) Organization, sequence, and expression of the murine S100 beta gene. Transcriptional regulation by cell type-specific cis-acting regulatory elements *J Biol Chem* 268(27): 20502-20511
 - 88 Mulder H, Ahren B, Stridsberg M, Sundler F (1995) Non-parallelism of islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin gene expression in rats islets following dexamethasone treatment. *Diabetologia* 38(4): 395-402.
 - 89 Linnington C, Webb M, Woodhams PL (1984) A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol.* 6(6): 387-96.
 - 90 Jung M, Sommer I, Schachner M, Nave KA (1996) Monoclonal antibody O10 defines a conformationally sensitive cell-surface epitope of proteolipid protein (PLP): evidence that PLP misfolding underlies dysmyelination in mutant mice. *J Neurosci.* 15;16(24): 7920-9.
 - 91 Amar-Costesec A, Godelaine D, Van den Eynde B, Beaufay H (1994) Identification and characterization of the tumor-specific P1A gene product. *Biol Cell.* 81(3): 195-203.
 - 92 Unkeless JC. (1979) Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 19;150(3): 580-96
 - 93 Agger R, Crowley MT, Witmer-Pack MD (1990) The surface of dendritic cells in the mouse as studied with monoclonal antibodies. *Int Rev Immunol.* 6(2-3):89-101
 - 94 Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR,

- Nave KA (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* 18(1):59-70.
- 95 Murphy C, Beckers J, Ruther U (1995) Regulation of the human C-reactive protein gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 270(2):704-8.
 - 96 Nave KA, Lai C, Bloom FE, Milner, RJ (1987) Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM20 protein of central nervous system myelin. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5665-5669
 - 97 Yool DA, Klugmann M, McLaughlin M, Vouyiouklis DA, Dimou L, Barrie JA, McCulloch MC, Nave KA, Griffiths IR (2001) Myelin Proteolipid Proteins Promote the Interaction of Oligodendrocytes and Axons. *J Neuroscience Res* 63: 151-164
 - 98 Jung, M (2000) Konformation und Interaktion des Proteolipid Proteins und seiner mutanten Isoformen, Dissertation
 - 99 Heizmann CW (1999) Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res* 24:1099-1102
 - 100 Heizmann CW, Cox JA (1998) New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca²⁺-, Zn²⁺- and Cu²⁺-binding protein family. *Biometals* 11: 383-397
 - 101 Tiu SC, Chan WY, Heizmann CW, Schafer BW, Shu SY, Yew DT (2000) Differential expression of S100B and S100A6(1) in the human fetal and aged cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 7;119(2): 159-68.
 - 102 Kojima K, Reindl M, Lassmann H, Wekerle H, Linington C (1997) The thymus and self-tolerance: co-existence of encephalitogenic S100 beta-specific T cells and their nominal autoantigen in the normal adult rat thymus. *Int Immunol.* 9(6): 897-904
 - 103 Weiss L (1988) *Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology.* 6. Auflage, Urban & Schwarzenberg, Baltimore
 - 104 Gyr KE, Meier R (1993) Pharmacodynamic effects of Sandostatin in the gastrointestinal tract. *Digestion* 54 Suppl 1: 14-19
 - 105 Viollet C, Prevost G, Maubert E, Faivre-Baumann A, Gardette R, Kordon C, Loudes C, Slama A, Epelbaum J (1995) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Fundam Clin Pharmacol* 9(2): 107-113
 - 106 Uyttenhove C, Godfraind C, Lethe B, Amar-Costesec A, Renauld JC, Gajewski TF, Duffour MT, Warnier G, Boon T, Van den Eynde BJ (1997) The expression of mouse gene P1A in testis does not prevent safe induction of cytolytic T cells against a P1A-encoded tumor antigen. *Int J Cancer.* 27;70(3): 349-56.
 - 107 Iglesias A, Bauer J, Litzenburger T, Schubart A, Linington C (2001) T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36(2): 220-34
 - 108 Haase CG, Guggenmos J, Brehm U, Andersson M, Olsson T, Reindl M, Schneidewind JM, Zettl UK, Heidenreich F, Berger T, Wekerle H, Hohlfeld R, Linington C (2001) The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. *J Neuroimmunol.* 1;114(1-2): 220-225
 - 109 Klein L, Kyewski B (2000) "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med.* 78(9):483-94
 - 110 Degermann S, Surh CD, Glimcher LH, Sprent J, Lo D (1994) B7 expression on thymic

- medullary epithelium correlates with epithelium-mediated deletion of V beta 5+ thymocytes. *J Immunol.* 152(7):3254-63.
- 111 Velazquez C, DiPaolo R, Unanue ER (2001) Quantitation of lysozyme peptides bound to class II MHC molecules indicates very large differences in levels of presentation. *J Immunol* 166(9):5488-94
 - 112 Naspetti M, Aurrand-Lions M, DeKoning J, Malissen M, Galland F, Lo D, Naquet P (1997) Thymocytes and RelB-dependent medullary epithelial cells provide growth-promoting and organization signals, respectively, to thymic medullary stromal cells. *Eur J Immunol.* 27(6):1392-7.
 - 113 Egwuagu CE, Charukamnoetkanok P, Gery I (1997) Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J Immunol* 1;159(7):3109-12.
 - 114 Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Bennink JR (2001) Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J Exp Med.* 4;193(11):1319-26.
 - 115 Van den Eynde BJ, Morel S. (2001) Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol.* 13(2):147-53
 - 116 Barton GM, Rudensky AY (1999) Evaluating peptide repertoires within the context of thymocyte development. *Seminars in Immunology* 11: 417-422
 - 117 Mason D (1998) A very high level of cross-reactivity is an essential feature of the T cell receptor. *Immunol Today* 19: 359-404
 - 118 Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O, Unanue ER (1999) Cutting edge: negative selection of immature thymocytes by a few peptide-MHC complexes: differential sensitivity of immature and mature T cells. *J Immunol.* 15;162(6):3117-20
 - 119 Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P (2000) Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13(6): 829-40
 - 120 Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O, Unanue ER (1999) Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11(4):453-62
 - 121 Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 10(12):1969-80.
 - 122 McHugh RS, Shevach EM, Thornton AM (2001) Control of organ-specific autoimmunity by immunoregulatory CD4(+)CD25(+) T cells. *Microbes Infect.* 3(11):919-27
 - 123 Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 20;188(2):287-96
 - 124 Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1;162(9):5317-26.
 - 125 Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an ago-

- nist self-peptide. *Nat Immunol.* 2(4):301-6.
- 126 Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. (2001) Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 20;194(4):427-38.
 - 127 Weiss S, Bogen B (1991) MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. *Cell.* 22;64(4): 767-776
 - 128 Oukka M, Colucci-Guyon E, Tran PL, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Lotteau V, Kosmatopoulos K (1996) CD4 T cell tolerance to nuclear proteins induced by medullary thymic epithelium. *Immunity* 4(6): 545-553.
 - 129 Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol.* 151(3):673-84.
 - 130 Humblet C, Rudensky AY, Kyewski B (1994) Presentation and intercellular transfer of self antigen within the thymic microenvironment: expression of the E alpha peptide-I-Ab complex by isolated thymic stromal cells. *Int Immunol.* 6(12):1949-58.
 - 131 van Meerwijk JP, Marguerat S, Lees RK, Germain RN, Fowlkes BJ, MacDonald HR. (1997) Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med.* 3;185(3):377-83.
 - 132 Schmidt EE, Schibler U (1995) High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids. *Development* 121(8):2373-83
 - 133 Hecht NB (1995) The making of a spermatozoon: a molecular perspective. *Dev Genet.* 16(2):95-103
 - 134 Eddy EM, O'Brien DA (1998) Gene expression during mammalian meiosis. *Curr Top Dev Biol.* 37:141-200
 - 135 Kleene KC (2001) A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev* 106(1-2):3-23
 - 136 Miyagi Y, Kerr S, Sugiyama A, Asai A, Shibuya M, Fujimoto H, Kuchino Y (1995) Abundant expression of translation initiation factor EIF-4E in post-meiotic germ cells of the rat testis. *Lab Invest* 73(6):890-8
 - 137 Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler-Kan E, Palmer E, Hollander GA. (2000) Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol.* 165(4):1976-83.
 - 138 Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennery P, Stevenson DK, Benaron DA. (1997) Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol.* 66(4):523-31.
 - 139 Contag CH, Contag PR, Mullins JJ, Spilman SD, Stevenson DK, Benaron DA. (1995) Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol.* 18(4):593-603.

7 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke Herrn Prof. Dr. Bruno Kyewski für die Themenstellung der Arbeit und die Betreuung. Herrn Prof. Dr. Schirmmacher danke ich für die Bereitsstellung des Arbeitsplatzes und ganz besonders für die Übernahme des Referats. Herrn PD Dr. Volker Lehmann danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats. Frau Dr. Ruth Ganss danke ich für die Anregungen und für ihre Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Herbert Spring danke ich für seine freundliche und unersetzliche Hilfe bei der Auswertung der Doppelfluoreszenzen und der Anfertigung von Fotos. Herrn Prof. Dr. Willem von Ewijk danke ich für die Begutachtung der Immunhistologie-Präparate. Frau Prof. Dr. Jacqueline Trotter-Kyewski und ihrer Gruppe danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern und Zelllinien und für viel guten Rat.

Herrn Klaus Hexel danke ich für die Durchführung der Zellsortierung. Bei Sonja Hoeflinger und Dr. Ludger Klein möchte ich mich für die vielen guten Tips bedanken. Herrn Gehring und Frau Thomas danke ich für die hervorragende Betreuung der Versuchstiere.